

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA PINHELLI



CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA NifAQ6 DE *Herbaspirillum seropedicae*

CURITIBA

2020

FERNANDA PINHELLI

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA PROTEÍNA NifAQ6 DE *Herbaspirillum seropedicae*

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências-Bioquímica pelo curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Co-orientador: Dr. Adriano Alves Stefanello

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Pinhelli, Fernanda.

Caracterização bioquímica da proteína NifAQ6 de *Herbaspirillum seropedicae*. / Fernanda Pinhelli. – Curitiba, 2020.

66 f. : il.

Orientador: Emanuel Maltempi de Souza.

Coorientador: Adriano Alves Stefanello.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica.

1. Proteína nifA. 2. *Herbaspirillum seropedicae*. 3. Gramínea. 4. Proteínas.
I. Título. II. Souza, Emanuel Maltempi de. III. Stefanello, Adriano Alves. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

CDD (22. ed.) 584.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA) - 40001016003P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FERNANDA PINHELLI** intitulada: **Caracterização bioquímica da proteína NifAQ6 de *Herbaspirillum seropedicae***, sob orientação do Prof. Dr. EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Abril de 2020.

Assinatura Eletrônica

04/05/2020 21:01:21.0

EMANUEL MALTEMPI DE SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/04/2020 17:09:04.0

ROSE ADELE MONTEIRO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/04/2020 17:43:37.0

ANA CLAUDIA BONATTO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1672 - E-mail: pgbioq@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 40365

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 40365

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por sua graça cuidado e amor;

Agradeço ao Professor Emanuel Maltempi de Souza, pela orientação, por ter me aceitado como aluna durante todos esses anos e por todos os aprendizados;

Agradeço ao Adriano Alves Stefanello, pelas boas conversas sobre NifA, ciência e até política, pela orientação, correções e ajuda com experimentos;

Aos meus colegas de laboratório 279, Luis Paulo, Manuel, Manu, Maritza, Marina, Silvia e Alejandra, pela boa convivência e boa amizade;

Aos técnicos Dona Rose, Bruna e Valter, pela dedicação e toda ajuda;

À todos os amigos que conquistei durante o mestrado, em especial, Marcos, Erick, Breno, Teles, Anna Luiza, Gustavo e Gabi;

À todos do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial a todo grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio;

Aos meus bioamigos que mesmo distante sempre torcem por mim, Luana, Carol, Mc, Mari, Rafa, Renata, Tabata e Jaque, em especial o Luv, que assistiu todas as minhas apresentações e acreditou sempre no meu potencial.

À Mai, minha eterna melhor amiga, que tenho certeza que sempre torce por mim e se preocupa comigo;

À minha família, que sempre me regaram com muito amor e carinho, e me incentivaram a ser uma pessoa melhor.

Ao André, meu parceiro até aqui, que dividiu tudo comigo, me apoiando e cuidando sempre.

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma Betaproteobacteria diazotrófica encontrada em associação com gramíneas de interesse econômico, como sorgo, milho e arroz. A fixação de nitrogênio em *H. seropedicae* é finamente regulada a nível transcricional pela proteína NifA. A proteína NifA é uma ativadora transcricional dos genes *nif* e pertence à família de ativadores transcricionais dependentes de σ^{54} . A regulação da atividade dessa proteína depende dos níveis de amônio e oxigênio disponíveis. A regulação da atividade de NifA por amônio ocorre por meio de uma possível interação de seu domínio GAF N-terminal com proteínas da família PII, GlnB e GlnK, enquanto a regulação por oxigênio envolve um conjunto de 4 cisteínas regularmente espaçadas (Cys-X11-X19-Cys-X4-Cys) localizadas ao final do domínio AAA+ e início do interdomínio ID. Um trabalho anterior mostrou que uma proteína quimérica (NifAQ6) contendo a região C-terminal da NifA de *A. vinelandii* (posição 417 até 522) e a região N-terminal da proteína NifA de *H. seropedicae* (posição 1 até 409) não possui sensibilidade ao oxigênio e mantém o mesmo padrão de regulação por amônio observado em NifA de *H. seropedicae*, o que facilita o estudo da regulação da atividade de NifA por GlnK. Sabendo disso, o objetivo geral deste trabalho foi entender o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* pelas proteínas PII, através da caracterização *in vitro* da interação entre a proteína NifAQ6 e proteínas PII de *H. seropedicae*. Para isso, as proteínas NifAQ6, GlnK e GlnB, foram superexpressas em *E. coli*, purificadas, e utilizadas em ensaios de *pull-down* que mostraram a interação direta entre NifA e proteínas PII independente da presença ou ausência dos efetores 2OG, ATP e ADP.

Palavras-chave: NifA, Proteínas PII, *Herbaspirillum seropedicae*.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is a diazotrophic Betaproteobacterium found in association with grasses of economic interest such as sorghum, maize, and rice. Nitrogen fixation in *H. seropedicae* is finely regulated at the transcriptional level by the NifA protein. NifA is a transcriptional activator of the nitrogen fixation related *nif* genes, and belongs to the family of σ^{54} -dependent transcriptional activators. The regulation of this protein's activity depends on the available nitrogen and oxygen levels. Ammonium regulation works by means of the proposed interaction of the NifA N-terminal GAF domain with the PII family proteins, GlnB and GlnK, which are able to activate NifA, while the oxygen control involves a set of 4 cysteines (Cys-X11-X19-Cys-X4-Cys), located at the end of the AAA + domain and at the beginning of the interdomain ID. A previous study found that a chimeric protein (called NifAQ6), which contains the C-terminal region of *A. vinelandii* NifA (positions 417 to 522) and the N-terminal region of the *H. seropedicae* NifA protein (positions 1 to 409), has been shown to have no oxygen sensitivity while retaining the ammonium regulation characteristic of *H. seropedicae* NifA, which facilitates the study of NifA activation by GlnK *in vitro*. Thus, the general objective of this work was to probe the mechanism of activity control of *H. seropedicae* NifA protein by PII proteins, through the *in vitro* characterization of the interaction of NifAQ6 and the PII proteins of *H. seropedicae*. For this, the proteins NifAQ6, GlnK and GlnB were overexpressed in *E. coli*, purified, and used for pull-down assays which showed the direct interaction between NifA and PII proteins regardless of the presence or absence of the common PII effectors 2-oxoglutarate, ATP and ADP.

Palavras-chave: NifA, PII proteins, *Herbaspirillum seropedicae*.

LISTA DE ABREVIATURAS

2OG	2- oxoglutarato (α -cetoglutarato)
AAA+	[família de proteínas] ATPases associadas a diversas atividades celulares
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
Amp	Ampicilina
APS	Persulfato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
bEBP	<i>Bacterial enhancing binding protein</i>
Cm	Cloranfenicol
DMSO	Dimetilsulfóxido, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Mistura equimolar de deoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
DO _{600nm}	Densidade óptica (absorbância) medida com comprimento de onda de 600nm
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, $(\text{CH}_2\text{COOH})_2\text{N}-(\text{CH}_2)_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$
FAD	Flavina-adenina-dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
GAF	[<i>domínio proteico</i>] domínio associado a fosfodiesterases cGMP-específicas, adenilil ciclases e FhlA
GDH	Glutamato desidrogenase
GOGAT	Glutamina-oxoglutarato aminotransferase
GS	Glutamina sintetase
HTH	[<i>domínio proteico</i>] Domínio de ligação ao DNA contendo um motivo hélice-volta- hélice
IPTG	Isopropil – β - D-1-tiogalactopiranosídeo
Kacf	Mistura de acetato de potássio e ácido fórmico
kDa	kiloDaltons
Km	canamicina
LA	Meio de cultivo <i>Lysogeny Agar</i>
LB	Meio de cultivo <i>Lysogeny broth</i>
MCSI	Sítio de policlonagem 1 do vetor pETDuet1 e derivados
MCSII	Sítio de policlonagem 2 do vetor pETDuet1 e derivados
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado

NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NFDM	NH_4^+ -free <i>Davis minimal medium</i>
ONPG	Orto-nitrofenil- β -galactopiranosídeo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG8000	Polietilenoglicol com massa molar numérica média de 8000 Daltons
Pi	Fosfato inorgânico, PO_4^{2-}
PII-UMP	PII com grupo uridilil ligado ao resíduo de tirosina 51
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TEMED	Tetrametilerilenodiamina $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$
UMP	Uridina monofosfato
UTP	Uridina trifosfato

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- REAÇÃO DE REDUÇÃO DE N_2 A NH_3 CATALISADA PELA NITROGENASE.	15
FIGURA 2- ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.	37
FIGURA 3- ATIVIDADE DE β – GALACTOSIDASE DE CÉLULAS EXPRESSANDO A PROTEÍNA NifA.	38
FIGURA 4- EXPRESSÃO DE GlnK e GlnB I.	39
FIGURA 5- PURIFICAÇÃO GlnB EM COLUNA DE HEPARINA.	40
FIGURA 6- PURIFICAÇÃO de GlnB EM COLUNA DE TROCA IÔNICA.	41
FIGURA 7 - PURIFICAÇÃO de GlnK EM COLUNA DE HEPARINA.	42
FIGURA 8- PURIFICAÇÃO DE his - GlnB EM COLUNA DE ÍONS NÍQUEL.	43
FIGURA 9 - PURIFICAÇÃO DE his-GlnK EM COLUNA DE ÍONS NÍQUEL.	44
FIGURA 10- PURIFICAÇÃO de GlnD EM COLUNA CARREGADA COM ÍONS NÍQUEL.	45
FIGURA 11 - TESTE DE EXPRESSÃO DE NifAQ6 em <i>E. coli</i> JM109(λ DE3) pRT22.	46
FIGURA 12 - TESTE DE EXPRESSÃO DE NifAQ6 EM DIFERENTE CONCENTRAÇÕES DE IPTG.	47
FIGURA 13- PURIFICAÇÃO de NifAQ6 EM COLUNA CARREGADA COM ÍONS COBALTO.	48
FIGURA 14 - PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE HEPARINA.	49
FIGURA 15- PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE TROCA IÔNICA.	50
FIGURA 16- PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.	51
FIGURA 17 - PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.	52
FIGURA 18- URIDILILAÇÃO DE His - GlnB COM CAUDA DE HISTIDINA.	53
FIGURA 19 - ANÁLISE POR SDS - PAGE DE FRAÇÕES ELUÍDAS DE MAGNEHIS APÓS ENSAIOS DE INTERAÇÃO GlnK E NifAQ6 PURIFICADAS.	54
FIGURA 20 - ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE NifAQ6 COM His-GlnB.	56
FIGURA 21 - ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE NifAQ6 COM His-GlnK.	56
FIGURA 22- INTERAÇÃO DE NifAQ6 COM His- GlnB URIDILILADA.	57
FIGURA 23 – ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE GlnB COM VARIANTES DE NifAQ6.	58
FIGURA 24- MECANISMO FISIOLÓGICO PARA A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE HsNifA EM RESPOSTA A AMÔNIO.	59

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.	25
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NFDM.	28
TABELA 3 - SISTEMA DE REAÇÃO PARA SEQUENCIAMENTO DE DNA.	31
TABELA 4- COMPOSIÇÃO DOS GÉIS SDS-PAGE.....	31
TABELA 5- COMPOSIÇÃO DOS GÉIS NÃO DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. CICLO DO NITROGÊNIO E ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS	14
1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO	15
1.3. CAPTAÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO	15
1.4. PROTEÍNAS PII	17
1.5. OS GENES <i>nif</i> E A ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE AMÔNIO	19
1.6. PROTEÍNA NifA	20
1.6.1. NifA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	21
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	24
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. MICRORGANISMOS E VETORES	25
4.2. MEIOS DE CULTURA	28
4.3. ANTIBIÓTICOS	28
TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	28
4.4. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE B-GALACTOSIDASE EM <i>E. coli</i>	29
4.5. MANIPULAÇÃO DO DNA	29
4.5.1. Extração de DNA plasmidial	29
4.5.2. Eletroforese de DNA	30
4.5.3. Clonagem de DNA	30
4.5.4. Sequenciamento de DNA	30
4.6. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS	31
4.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)	31
4.6.2. Eletroforese não desnaturante de proteínas	32
4.6.3. Expressão heteróloga das proteínas PII	32
4.6.4. Expressão heteróloga proteína NifAQ6	33
4.6.5. Expressão heteróloga da proteína GlnD	33
4.6.6. Purificação das proteínas PII nativa	33
4.6.7. Purificação das proteínas PII com cauda de histidina	34
4.6.8. Purificação de GlnD	34
4.6.9. Purificação de NifAQ6	35

4.6.10.	Ensaio de co – precipitação (<i>pull – down</i>).....	35
4.6.10.1.	Quantificação do sinal de NifAQ6	36
4.6.11.	Uridililação das PII	36
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1.	ATIVIDADE DE NifAQ6 <i>in vivo</i>	37
5.2.	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII.....	38
5.2.1.	Expressão e purificação das proteínas PII nativas.....	38
5.2.2.	Expressão e purificação das proteínas PII com cauda de histidina.....	42
5.3.	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD.....	44
5.4.	TESTES DE EXPRESSÃO DE NifAQ6 em JM109 (Δ DE3) pRT22	45
5.5.	PURIFICAÇÃO DE NifAQ6.....	47
5.6.	URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA His-GlnB	52
5.7.	ENSAIOS DE <i>PULL- DOWN</i>	53
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7.	REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1. CICLO DO NITROGÊNIO E ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS

O ciclo do nitrogênio é um dos ciclos mais importantes nos ecossistemas terrestres, pois o nitrogênio compõe biomoléculas essenciais como proteínas, ácidos nucleicos e clorofila, sendo um fator limitante para produtividade primária local (GRUBER & GALLOWAY, 2008). Esse elemento é abundante na atmosfera na forma molecular (N_2), que é pouco reativa e não pode ser metabolizada por nenhum eucarioto e nem mesmo pela maioria dos procariotos. Apenas alguns organismos, denominados diazotróficos, são capazes de realizar a conversão do nitrogênio molecular (N_2) a amônio (NH_3), uma molécula facilmente assimilável. A capacidade de fixar nitrogênio é distribuída em diversos grupos pouco relacionados como sulfobactérias verdes, firmibacterias, actinomicetos, cianobactérias e proteobactérias, enquanto que em eucariontes essa capacidade não foi relatada (RAYMOND *et al.*, 2004).

Os organismos diazotróficos podem ser de vida livre, associativos e simbiontes. Quando associados às plantas, além da fixação biológica de nitrogênio, essas bactérias podem promover o crescimento vegetal através da produção de substâncias que auxiliam o crescimento radicular, sendo então consideradas bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) (DIXON E KAHN, 2004; MOREIRA *et al.*, 2010). Algumas espécies ainda podem ser fitopatógenas, como *H. rubrisubalbicans*, causador da doença da estria mosqueada em algumas variedades de cana-de-açúcar (OLIVARES *et al.*, 1997).

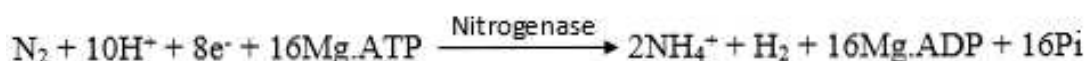
O organismo estudado neste trabalho, *Herbaspirillum seropedicae*, é uma espécie de microrganismo diazotrófico, Gram-negativo, que pertence à classe β das Proteobactérias. *H. seropedicae* foi isolado pela primeira vez a partir da rizosfera e de raízes de gramíneas de interesse econômico como sorgo, milho e arroz (BALDANI *et al.*, 1986). *H. seropedicae* é capaz de fixar N_2 em condições de microaerobiose e baixa concentração de amônio extracelular (FU & BURRIS, 1989). A regulação da fixação de nitrogênio neste organismo foi alvo de diversos estudos (comentados na seção 1.6.1) que a caracterizaram como primariamente uma regulação transcricional da expressão dos genes *nif* controlada pelo ativador transcricional NifA, e respondendo à disponibilidade de amônio e oxigênio.

1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

A fixação biológica de nitrogênio é realizada através de um complexo enzimático conhecido como nitrogenase. Esse complexo é composto por duas proteínas, a dinitrogenase redutase (proteína Fe ou NifH), produto do gene *nifH*, e a dinitrogenase (proteína Fe-Mo ou NifDK), produto do gene *nifDK*. A proteína Fe é um dímero γ_2 e contém um núcleo 4Fe-4S, enquanto a proteína Fe-Mo é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, com dois grupos prostéticos: 2 centros P e 2 cofatores ferro molibdênio (FeMo). Ambas as enzimas são inativadas pela ligação de oxigênio (O_2) aos grupos metálicos presentes em sua estrutura nativa (DIXON & KHAN, 2004).

A reação de redução de dinitrogênio gasoso a amônio (FIGURA 1), catalisada pela nitrogenase, se inicia quando a proteína Fe é reduzida por ferredoxina ou flavodoxina, e liga-se a MgATP, provocando uma diminuição no seu potencial de redução em aproximadamente -120 mV para cerca de -400 mV (LANZILOTTA *et al.*, 1997). Essa redução no potencial propicia a transferência de elétrons da proteína Fe para a proteína Fe-Mo, que possui o sítio ativo da enzima (BURRIS, 1991). A transferência de elétrons está associada à hidrólise de MgATP para MgADP e Pi, sendo que ADP inibe a reação, e deve ser substituído novamente a ATP para que um novo elétron possa ser transferido da proteína Fe para a proteína Fe-Mo. A dinitrogenase catalisa a redução de outros substratos além do nitrogênio gasoso, entre eles cianeto, metilisocianeto, azida, acetileno, ciclopropeno e diazirina. Essa reação demanda um alto gasto de ATP (figura 1), e conseqüentemente é um processo finamente regulado (BURRIS, 1991; DIXON & KHAN, 2004).

FIGURA 1- REAÇÃO DE REDUÇÃO DE N_2 A NH_3 CATALISADA PELA NITROGENASE.



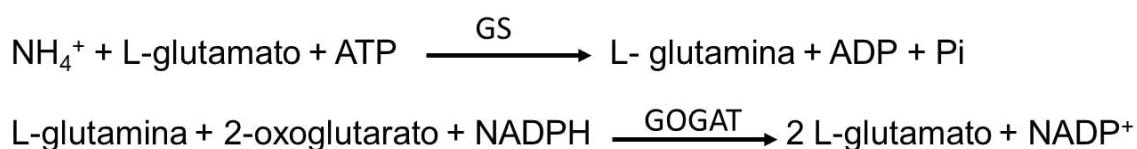
Fonte: (Burris, 1991).

1.3. CAPTAÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO

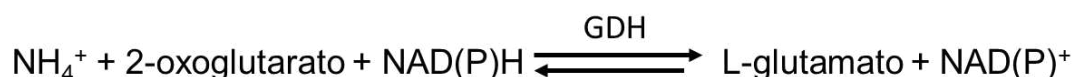
As membranas bacterianas são permeáveis a NH_3 e a difusão pode ocorrer nos dois sentidos. Essa difusão não é controlada e é muito lenta em pH baixo ou neutro. Quando os níveis de amônio extracelular estão altos, a passagem de amônio através da membrana se dá em resposta ao gradiente de concentração, podendo suprir o metabolismo celular. Por outro lado, quando a concentração de amônio extracelular está baixa, surge a necessidade de proteínas transportadoras de NH_4^+ (KLEINER, 1985).

A família de proteínas transportadoras de amônio (Amt) é encontrada em bactérias, arqueias, fungos, plantas e animais. As proteínas Amt possuem um núcleo conservado de 11 hélices transmembranas e C terminal intracelular, formando um canal hidrofóbico pelo qual as moléculas de amônia passam. Normalmente a proteína possui 400-450 resíduos de aminoácidos, e em alguns casos a região C terminal pode ser estendida (JAVELLE *et al.*, 2004). Em *E. coli*, o principal canal de amônia é a proteína AmtB, um trímero estável, cujo gene está presente no operon *glnKamtB*. Em altas concentrações de amônio este operon é pouco transcrito, enquanto que quando a concentração de amônio diminui, a expressão do operon é induzida (JAVELLE *et al.*, 2005). O transportador AmtB apresenta grande afinidade por amônio que, quando se liga ao canal de entrada da proteína, é desprotonado a amônia devido à entrada em um canal que reduz pKa para <6. Ao atingir o meio intracelular, a amônia, é reprotonada a amônio (KHADEMI *et al.*, 2004).

O amônio assim obtido é convertido em glutamato e glutamina, que por sua vez servem como doadores de nitrogênio para reações biossintéticas. Existem duas vias principais de assimilação; uma delas envolve a ação sequencial das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase (GS-GOGAT), que produzem glutamato a partir de amônia e 2- oxoglutarato (MERRICK & EDWARDS, 1995):



A outra via de assimilação é realizada através da enzima glutamato desidrogenase (GDH), que catalisa uma aminação redutora de 2-oxoglutarato por amônia que resulta em glutamato, em uma reação que depende de NADPH (MERRICK & EDWARD, 1995):



Na maioria das bactérias, a via GS-GOGAT é utilizada principalmente em condições limitantes de amônia, uma vez que a via GDH é ineficaz nestas condições devido ao Km relativamente alto da enzima (cerca de 1 mM) (MERRICK e EDWARDS, 1995).

Em proteobactérias, proteínas da família PII, GlnK e GlnB, atuam como reguladores negativos do transportador AmtB, de acordo com a disponibilidade nitrogênio, devido à formação

do complexo GlnK – AmtB na membrana (COUTTS *et al.*, 2002). Em *H. seropedicae*, *amtB* e *glnK* são coexpressos juntamente com o gene *nImA* (previamente denominado apenas *orf1*, e de função desconhecida), e a expressão desse operon *nImAamtBglnK* é regulada através de um promotor dependente de σ^{54} , que é ativado por NtrC, quando a disponibilidade de nitrogênio é limitada (NOINDORF *et al.*, 2006). *glnB*, por outro lado, é um gene monocistônico, expresso constitutivamente (BENELLI *et al.*, 1997). O papel das proteínas PII e o mecanismo pelo qual regulam a assimilação de amônio são bastante semelhantes em *H. seropedicae* e *E. coli*, e são revisados na seção seguinte.

1.4. PROTEÍNAS PII

As proteínas PII são amplamente distribuídas nos seres vivos, estando presentes tanto em eucariontes quanto em procariontes. As proteínas da família PII podem ser divididas em sete grandes grupos baseado em análises filogenéticas, sendo que o grupo de maior relevância para este trabalho é o grupo B/K que inclui as proteínas GlnB e GlnK de Proteobactérias (SANT'ANNA *et al.*, 2009). Em Bacteria e Archaea, essas proteínas participam da integração de sinais dos níveis intracelulares de carbono e nitrogênio; a detecção desses sinais fornece a informação necessária para controlar a assimilação de nitrogênio (NINFA e ATKINSON, 2000). As proteínas PII são homotriméricas; em proteobactérias, especificamente em *E. coli*, cada monômero possui 112 aminoácidos e três loops importantes: loop-T (37-55), loop-B (82-88) e loop-C (102-105), sendo esta estrutura bastante conservada. Os loops B e C formam o sítio de ligação a micromoléculas efetoras, que é localizado entre dois monômeros adjacentes. O T-loop é uma estrutura grande e móvel responsável pela maioria das interações com PII já estudadas; em proteobactérias, o resíduo Tyr51 presente neste loop pode ser modificado por uridilação reversível (CARR *et al.*, 1996).

A função das proteínas PII como sensores de carbono e nitrogênio depende de mudanças conformacionais geradas por sua ligação a moléculas efetoras como ATP, ADP e 2-oxoglutarato (2-OG), e de modificações pós-traducionais no loop-T (NINFA e JIANG, 2005; MERRICK, 2015). ATP e ADP ligam-se competitivamente aos mesmos sítios no trímero de PII, e as diferenças de conformação ocasionadas por cada um sinalizam o status energético da célula. A ligação de PII a 2-OG, por sua vez, serve como sinal dos níveis de intracelulares de carbono (por 2-OG ser um intermediário do ciclo do ácido cítrico) e nitrogênio (por 2-OG ser substrato para as reações de assimilação de amônio catalisadas por GOGAT e GDH). 2-Oxoglutarato só pode ligar-se aos sítios ativos de PII na presença de ATP, tornando, portanto, a sinalização de energia celular epistática sobre a sinalização de concentração de carbono/nitrogênio (NINFA e JIANG, 2005;

HUERGO *et al.*, 2012; MERRICK, 2015). A ligação de efetores também influencia a ocorrência de uridililação reversível de seu resíduo Tyr51 por GlnD em proteobactérias, com a presença de ATP e 2-OG geralmente favorecendo a uridililação (BONATTO *et al.*, 2007; NINFA & JIANG, 2005).

O modelo proposto de controle das PII sobre o fluxo de amônio em proteobactérias é baseado principalmente nos estudos realizados com as proteínas de *E. coli*. A disponibilidade de amônio leva a queda na concentração intracelular de 2-OG, devido a seu consumo na assimilação do amônio por GOGAT ou GDH; nesta situação, as proteínas PII são encontradas ligadas a ATP/ADP e 0-1 moléculas de 2-OG por trîmero, e majoritariamente desuridililadas. Genes que codificam para proteínas PII, transcritos constitutivamente (GlnB) representam a maior parte do *pool* de PII. O canal de amônio AmtB se encontra bloqueado por interação com PII, e NtrB tem sua atividade quinase inibida por PII, impedindo a transcrição ativada por NtrC de ocorrer. A queda nos níveis de amônio disponíveis leva ao acúmulo de 2-OG intracelular, à ligação de 2-3 moléculas de 2-OG a cada trîmero de PII ligada a ATP, e à uridililação de PII por GlnD. Nesta condição, PII dissocia-se do canal de amônio AmtB (permitindo o fluxo de amônio para dentro da célula) e de NtrB (permitindo a ativação de NtrC, e consequentemente a transcrição de todo o regulon NtrC), e a própria concentração de PII intracelular aumenta com a transcrição NtrC-dependente de GlnK. Esse modelo de regulação parece bastante conservado em proteobactérias. Por exemplo, em *Azospirillum brasilense*, para que GlnK interaja com AmtB, é necessário que ela esteja na forma não uridililada, o que geralmente ocorre após um choque de amônio (RODRIGUES *et al.*, 2011). E em *H. seropedicae* após um choque de amônio, há um aumento de GlnK e GlnB associadas a membrana, o que não ocorre no mutante *amtB* (HUERGO *et al.*, 2010).

Em *H. seropedicae*, as duas proteínas PII presentes (GlnB e GlnK) podem ligar até três moléculas de ATP, ADP e 2-OG, todos com cooperatividade homotrópica negativa, sendo que a ligação de 2-OG estabiliza a ligação do ATP, aumentando a afinidade de PII por ATP (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A ligação competitiva dos efetores ATP e ADP causa alterações conformacionais nas proteínas PII de *H. seropedicae*, que podem influenciar na uridililação. Em *Herbaspirillum seropedicae*, tal como em *E. coli* e na maioria das proteobactérias, as proteínas PII são uridililadas pela atividade de uma uridiltransferase (GlnD) em resposta aos níveis de glutamina intracelular. Quando concentração de glutamina é alta, as PII são desuridililadas, e quando a concentração de glutamina é baixa as PII são uridililadas. Os níveis dos efetores podem também influenciar na atividade da GlnD (BONATTO *et al.*, 2007), a presença dos efetores α -

cetoglutarato e ATP, estimulam a uridililação, e inibem a atividade de desuridililação (BENELLI *et al.*, 2001).

Para GlnB a uridililação é mais eficiente na presença de ATP do que ADP. No entanto, para GlnK, a uridililação é similar na presença de ATP e ADP. (BONATTO *et al.*, 2012). Além de alterar a superfície do loop – T exposta para interações intermoleculares, a uridililação altera a afinidade de GlnB e GlnK por ATP/ADP, sendo a afinidade das proteínas uridililadas pelos nucleotídeos, menor do que a proteínas não uridililadas (OLIVEIRA *et al.*, 2015). O resultado disso é que, dependendo do estado de uridililação de PII e dos níveis intracelulares de ATP, ADP e 2-OG, as proteínas PII podem interagir com diferentes proteínas-alvo, regulando os metabolismos de carbono e nitrogênio.

1.5. OS GENES *nif* E A ALTERAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RESPOSTA AOS NÍVEIS DE AMÔNIO

Os genes de fixação de nitrogênio, conhecidos como genes *nif*, codificam para proteínas envolvidas na biossíntese, maturação e montagem do complexo nitrogenase (CHUBATSU *et al.*, 2012). *H. seropedicae* adquiriu o cluster *nif* através de transferência horizontal de genes. Esse cluster possui 46 ORFs que são organizadas em sete operons. A expressão destes operons depende do fator σ^{54} e da proteína ativadora de transcrição NifA (PEDROSA *et al.*, 2011).

O σ^{54} (*rpoN*) regula início da transcrição de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio em resposta à estímulos ambientais ou fisiológicos (KUTSU *et al.*, 1989). Este fator sigma único, não relacionado aos demais fatores sigma bacterianos, reconhece uma região conservada no promotor entre os elementos -12 e -24 a montante do início da transcrição do gene alvo e forma um complexo estável com o DNA (POPHAM *et al.*, 1989). Apesar de ser constitutivamente expresso (CASTAÑO & BASTARRACHEA, 1984), σ^{54} é intrinsecamente inativo, sendo a princípio capaz apenas de formar o complexo estável com o DNA e recrutar a RNA polimerase (ZHANG & BUCK, 2015). A transcrição só é iniciada quando uma *enhancer binding protein* bacteriana (BeBP) se liga a uma região UAS e recebe o estímulo apropriado, tornando – se capaz de hidrolisar o ATP, gerando uma mudança conformacional no σ^{54} (RAPPAS *et al.*, 2007).

Em *Herbaspirillum seropedicae*, a expressão de genes *nif* está sob o controle direto da BeBP NifA, cuja própria expressão está sob controle de um promotor σ^{54} e da BeBP NtrC (WASSEM *et al.*, 2000;2002), que é o regulador global de resposta a níveis de nitrogênio em proteobactérias e forma um sistema de dois componentes com NtrB (STOCK *et al.*, 2000). NtrC

(*ntrC*) (SHINGLER *et al.*, 1993) possui três domínios distintos: o N- terminal com uma atividade regulatória, o central onde se encontra o domínio catalítico que interage diretamente com a σ^{54} e possui um sítio de ligação de ATP, e o C- terminal que possui um motivo hélice- volta- hélice de ligação ao DNA (DRUMMOND *et al.*, 1986). Apenas quando NtrC está fosforilada em seu domínio N-terminal, ela se torna ativa e é capaz de formar o complexo aberto necessário para o início da transcrição. A proteína responsável por essa fosforilação é uma histidina quinase/fosfatase denominada NtrB, cuja atividade é alvo da regulação de GlnB (NINFA & MAGASANIK, 1986). Na presença de amônio, GlnB desuridilada interage com NtrB, inibindo sua atividade autoquinase e estimulando sua atividade fosfatase, levando a desfosforilação de NtrC, o que impede o início da transcrição dos genes do regulon NtrC (JIANG & NINFA, 1999). Na ausência de amônio, GlnB é uridilada por GlnD e não interage com NtrB; sem a inibição por GlnB, NtrB sofre autofosforilação e fosforila NtrC, que se torna capaz de ativar a transcrição (ATKINSON *et al.*, 1994). Dentre os genes transcritos a partir de NtrC, estão os do operon *nlnAglnKamtB*, que inclui a proteína PII GlnK, e o gene *nifA*, que codifica para o regulador específico dos genes *nif*.

1.6. PROTEÍNA NifA

O ativador transcricional NifA é membro da família das bEBPs e possui uma arquitetura conservada similar à de outras proteínas que também pertencem a essa da família. Nessa proteína são encontrados três domínios funcionais: o domínio do tipo GAF, localizado na região N-terminal, com função regulatória (DIXON & KAHN, 2004); o domínio central AAA+, que contém o motivo GAFTGA responsável pela interação com σ^{54} e os motivos Walker para clivagem de ATP; e o domínio C- terminal, que possui um motivo hélice-volta-hélice envolvido na ligação com o DNA e reconhecimento da região promotora (STUDHOLME & DIXON, 2003). Dois interdomínios característicos conectam esses domínios: o Q-linker conecta o domínio GAF ao domínio central (WOOTTON & DRUMMOND, 1989), e o ID- linker conecta o domínio central ao C- terminal (FISCHER, 1994). As proteínas NifA são separadas em dois modelos quanto ao mecanismo da regulação de sua atividade pelas concentrações de amônio e oxigênio.

O primeiro modelo descrito refere-se a NifA de organismos pertencentes, majoritariamente, à classe γ das proteobactérias. A regulação NifA já é bem descrita para dois organismos deste grupo: *A. vinelandii* e *Klebsiella pneumoniae*. Nestes organismos, *nifA* é co-transcrito com o gene *nifL*, sendo as duas proteínas, NifA e NifL, expressas constitutivamente (RAINA *et al.*, 1993). Em resposta condições ambientais, NifL é capaz de reprimir NifA, que é uma proteína intrinsecamente ativa (HILL *et al.*, 1996). Na presença de oxigênio, NifL é oxidada e

forma um complexo inativo com NifA; a inibição é aliviada quando NifL é reduzida, e a inibição por O₂ é epistática sobre a regulação por nitrogênio. Quanto a esta, há divergência de mecanismos entre *A. vinelandii* e *K. pneumoniae*. Em *A. vinelandii*, na presença de amônio, GlnK desuridilada interage com NifL, reforçando a inativação de NifA. Sob baixa concentração de amônio e de oxigênio, dois eventos ocorrem: GlnK é uridilada e não interage mais com NifL, aliviando a inibição de NifA (LITTLE *et al.*, 2002); e o domínio GAF de NifA interage com 2OG, o que também alivia a inibição de NifA por NifL (MARTINEZ-AGUDO *et al.*, 2004). Em *K. pneumoniae*, GlnK tem efeito ativador em vez de repressor; em baixa concentração de amônio e oxigênio, o gene *glnK* é transcrito a partir de seu promotor dependente de NtrC, e GlnK interage com NifL para aliviar a inibição desta sobre NifA (HE *et al.*, 1997).

No segundo modelo de regulação, descrito para proteínas NifA provenientes de α e β -proteobactérias, não há participação da proteína sensora NifL, sendo a atividade de NifA regulada diretamente por oxigênio e pela interação com proteínas PII em resposta aos níveis de amônio (ARSENE *et al.*, 1996; SOUZA *et al.*, 1991). Em *H. seropedicae*, a sensibilidade ao oxigênio se deve a um conjunto de quatro cisteínas localizadas em um motivo C-X11-C-X19-C-X4-C presente no final do domínio central e início do interdomínio ID (FISCHER *et al.*, 1988; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Estes quatro resíduos de cisteína coordenam um cluster de ferro-enxofre, que na forma reduzida torna a NifA ativa (FISCHER, 1994; SOUZA *et al.*, 1999). A regulação por amônio está vinculada a interações das proteínas PII com domínio GAF N-terminal de NifA (ARSENE *et al.*, 1996; INABA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 1999).

1.6.1. NifA de *Herbaspirillum seropedicae*

O gene *nifA* de *Herbaspirillum seropedicae* foi identificado por Souza e colaboradores (1991) pela alta similaridade com sequências de proteínas homólogas codificadas pelos genes *nifA* de *Klebsiella pneumoniae* e bactérias do gênero *Rhizobium*. Na análise das sequências reguladoras, foram encontrados locais específicos para ligação NifA, NtrC e IHF característico do promotor -24/ -12 (SOUZA *et al.*, 2000). A interação da região promotora com a subunidade σ^{54} , é essencial para o início da transcrição. Em condições de fixação de nitrogênio, a ligação de IHF, proteína que se liga ao DNA e induz seu dobramento, estimula a ativação da transcrição por NtrC, e inibe a ativação mediada por NifA, para evitar a superexpressão do seu próprio produto gênico (WASSEM *et al.*, 2002).

A regulação da atividade da proteína NifA é dependente dos níveis de amônio e oxigênio disponíveis. Souza e colaboradores (1999) estudaram a regulação por amônio e verificaram que

NifA de *H. seropedicae* é ativa em *A. brasilense*, sendo essa atividade reprimida por amônio, enquanto que em *E. coli*, a atividade de NifA é reprimida independente da concentração de amônio e oxigênio. Uma versão N- truncada da proteína foi construída ($\Delta(1-203)$ NifA), que é ativa em *E. coli* e *A. brasilense* independentemente dos níveis de amônio, no entanto reprimida pela presença de oxigênio. Estes resultados sugeriram que a regulação por oxigênio e nitrogênio são separadas espacialmente na proteína NifA. Souza e colaboradores (1999) avaliaram também o efeito de íons ferro na atividade da $\Delta(1-203)$ NifA, de *H. seropedicae*, e observaram que a omissão de Fe na cultura, leva a uma redução de cerca de 50% da atividade de NifA N-truncada. A presença de um quelante de cátions divalentes, EDTA, teve um efeito semelhante, levando a conclusão que íons Fe são importantes para a atividade da proteína.

A caracterização dos domínios funcionais de NifA de *H. seropedicae* foi realizada por Monteiro e colaboradores (1999, 1999b, 2001, 2003). Estudos de regulação da proteína $\Delta(1-203)$ NifA *in vivo* confirmaram que atividade da proteína independe da disponibilidade de amônio mas é sensível a presença de oxigênio (MONTEIRO *et al.*, 1999). Em seguida foi proposto um mecanismo de regulação por amônio através do domínio GAF, onde, na presença de amônio, resíduos presentes no domínio GAF interagem com resíduos dos domínios central e C- terminal, levando a uma conformação inativa (MONTEIRO *et al.*, 1999b, 2001). A regulação por oxigênio, por sua vez, envolve um conjunto de 4 cisteínas, C414-X₁₁-C426-X₁₉-C446-X₄-C451, localizadas ao final do domínio AAA+ e início do interdomínio ID. Oliveira e colaboradores (2009) mutagenizaram cada uma das quatro cisteínas desse motivo conservado, substituindo-os por serina, e avaliaram a atividade das proteínas mutantes *in vivo*. Nenhuma das proteínas mutantes apresenta atividade quando expressas em *E. coli*, mesmo na ausência de seus domínios GAF, embora ainda sejam capazes de formar ligação com o DNA. Neste mesmo trabalho, duas proteínas quiméricas contendo domínios de NifA de *H. seropedicae* e *A. vinelandii* foram avaliadas quanto a sua atividade em *E. coli*, e com isso constatou-se o domínio GAF de *H. seropedicae* pode inibir parcialmente os domínios central e C-terminal de *A. vinelandii*.

Proteínas da família PII estão relacionadas com a desrepressão de NifA na presença de amônio. Noindorf e colaboradores (2011) observaram que GlnK e GlnB são responsáveis pela ativação de NifA, sendo que a diferença funcional está relacionada com o nível de expressão de cada uma. Estudos subsequentes sugeriram que GlnK interage com o domínio GAF (1-203) independente do status de nitrogênio disponível. Sendo que, quando GlnK se encontra não uridililada, a interação é mais estável e pouco responsiva aos efetores de PII (ATP, ADP e 2OG), enquanto, quando GlnK está uridililada a interação é mais sensível aos níveis de efetores de PII,

sendo mais forte na presença de ATP e 2-OG e mais fraca na presença de ADP e 2-OG (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Buscando elucidar quais resíduos do domínio GAF estão envolvidos na interação entre GlnK e NifA. Stefanello (2011), construiu as variantes N- truncadas, NifA ($\Delta 165$) e NifA ($\Delta 45$). E ele observou que, a variante de NifA ($\Delta 165$) já não é capaz de ser inibida por disponibilidade amônio em *E. coli* e *H. seropedicae glnK-*, e que a variante ($\Delta 45$) é permanentemente inativa mesmo na presença de GlnK em *H. seropedicae*. Isto sugeriu um papel dos primeiros 165 resíduos, e possivelmente dos primeiros 45, no reconhecimento do sinal de ativação transmitido por GlnK.

Posteriormente, foi adotado um sistema de coexpressão de NifA e GlnK em *E. coli*, que mostrou que NifA de *H. seropedicae* pode ser ativada neste organismo desde que haja coexpressão de uma quantidade apreciável de uma proteína PII adequada (STEFANELLO *et al.*, 2020). Isto permitiu avaliar a capacidade de diferentes proteínas PII ativarem NifA. O resultado obtido foi que NifA de *H. seropedicae* pode ser ativada por GlnB de *H. seropedicae*, *A. brasiliense* e *E. coli*, e por GlnK de *H. seropedicae*, mas não pode ser ativada por GlnZ de *A. brasiliense*. Além disso, foi observado que os resíduos mais importantes para ativação da NifA por PII encontram-se entre os primeiros 48. Mutantes de GlnK incapazes de ligar ATP/ ADP ou contendo a deleção do T-loop ($\Delta (45-54)$) não conseguem ativar a NifA, e um mutante com baixa afinidade por 2-OG exibiu mínima capacidade de fazê-lo. Por outro lado, um mutante de GlnK que não pode ser uridililado estimulou tanto ou até mais a atividade da proteína NifA quando comparado com GlnK selvagem. Disto se concluiu que o efector ATP é essencial para ativação de NifA, o efector 2OG é o principal determinante da ativação de NifA em resposta a amônio, e a uridililação tem papel secundário na resposta. A mutagênese aleatória de *glnK*, seguida da seleção e sequenciamento de variantes de GlnK incapazes de ativar NifA, revelou uma concentração de mutações alocadas na face superior do trímero, onde se localiza o T-loop (STEFANELLO *et al.*, 2020), sugerindo que esta é a face de PII responsável pela interação direta com NifA.

A busca por uma variante de NifA resistente a oxigênio, mais tratável para a realização de mutagênese aleatória, para o estudo da regulação de NifA por amônio, levou à construção de variantes quiméricas contendo regiões N-terminais de NifA de *H. seropedicae* e C-terminais de *A. vinelandii* (STEFANELLO, 2018), dentre as quais uma construção (NifAQ6 – contendo os resíduos 1-409 de NifA de *H. seropedicae* e 417-522 de NifA de *A. vinelandii*) revelou-se promissora, por possuir atividade detectável (30-50% da atividade de NifA selvagem em ensaios de β -galactosidase em *E. coli*) e regulação por nitrogênio idêntica à de NifA de *H. seropedicae*.

Além disso, essa variante que, foi denominada NifAQ6, possui insensibilidade a oxigênio, o que a torna uma importante ferramenta para futuros ensaios *in vitro*.

A partir desta construção foi realizada mutagênese aleatória seguida de seleção de dois tipos de mutantes: um grupo que não mostrasse atividade em *E. coli* mesmo na presença de GlnK, e um que fosse ativo na ausência de GlnK. Os resultados levaram à conclusão de que o domínio GAF de NifA de *H. seropedicae* possui duas regiões distintas: a região entre os resíduos 14-172 consiste na região responsável pela dimerização de GAF e recepção do sinal ativador de GlnK; e a região entre os resíduos 176-194, localizada na hélice que conecta os domínios GAF e AAA+, é responsável por inibir a atividade de NifA ao forçar os domínios AAA+ a permanecerem diméricos (STEFANELLO, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* em resposta aos níveis de amônio e oxigênio tem sido extensivamente estudada ao longo dos anos. Em particular, a regulação do sistema NifA – PII de *H. seropedicae* até este momento possui algumas lacunas, notoriamente quanto a quais resíduos de NifA estariam envolvidos diretamente na interação com PII. O uso de ensaios *in vitro* de captura (*pull down*) pode ser uma abordagem para a localização desses resíduos a partir de uma biblioteca de mutantes de NifA inativos; no entanto, este ensaio ainda não foi realizado de maneira definitiva usando NifA de *H. seropedicae*, devido a dificuldades de manipulação de uma proteína insolúvel e sensível a O₂ (STEFANELLO, 2014). A proteína NifAQ6 se mostra promissora, porém, para a execução destes ensaios, uma vez que apresenta solubilidade melhor do que a da NifA selvagem, e não apresenta inibição por oxigênio. Este trabalho busca aprofundar o conhecimento da regulação do sistema NifA – PII de *H. seropedicae*, através da caracterização *in vitro* das interações entre PII e a NifA quimérica NifAQ6.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é entender o mecanismo de regulação da atividade da proteína NifA de *H. seropedicae* pelas proteínas PII. Para isto, a variante quimera NifAQ6 da proteína NifA, que é solúvel e não sensível ao oxigênio, mas ainda é regulada por amônio e GlnK, será utilizada. A interação entre esta proteína e proteínas PII será avaliada *in vitro* através de ensaios de *pull-down*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliação da atividade de NifAQ6 através da determinação de atividade de β – galactosidase;
- Superexpressão em *E. coli* da proteína NifAQ6 e purificação;
- Superexpressão em *E. coli*, e purificação das proteínas PII, GlnB e GlnK, nativas e com cauda de histidina;
- Estudar a interação entre a proteína NifAQ6 e as proteínas PII através de ensaios de co-precipitação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MICRORGANISMOS E VETORES

As bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 1.

TABELA 1- BACTÉRIAS E PLASMÍDEOS.

Bactérias	Genótipo/ Fenótipo	Referência/ Fonte
<i>Escherichia coli</i> TOP10	SmR; F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL endA1 λ -	SAMBROOK <i>et al.</i> , 1989.
<i>E.coli</i> JM109 (λ DE3)	F' traD36 proA+B+lacIq Δ (lacZ)M15/ Δ (lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thihsdR17 λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	YANISCH – PERRON, VIEIRA & MESSING, 1985.
<i>E. coli</i> BL21 (λ DE3)	F-ompT gal dcm lon hsdSB (RB-MB-) λ (DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	STUDIER & MOFFATT, 1986.

Plasmídeos	Resistência	Ancestral	Características	Referência
pRT22	Cm	pWVC22	Contém a fusão traducional <i>nifH</i> (<i>K. pneumoniae</i>):lacZ.	TULI e MERRICK, 1988.
Dxho*	Amp	PETDuet-1	Contém uma inserção no sítio <i>XhoI</i> (CTTCGAG) de pETDuet-1.	STEFANELLO, 2020.
Dxho*K	Amp	Dxho*	Contém o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de Dxho*.	STEFANELLO, 2018.

DNifA	Amp	pETDuet - 1	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet1.	STEFANELLO, 2014.
DN185	Amp	pETDuet – 1	Contém a variante do gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> que codifica para (Δ 1-185) <i>nifA</i> clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet-1.	STEFANELLO, 2014.
pAAS1501	Km	pET28a	Contém o gene que codifica a variante (Δ 1-185) da quimera NifAQ6 clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET28a, sem cauda his.	STEFANELLO, 2018.
pAAS1632	Km	pET28a	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET28a.	STEFANELLO, 2018.
pAAS1637	Amp	Dxho*K	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de Dxho*K.	STEFANELLO, 2018.
pAAS1518	Amp	pET29a	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 clonado <i>XbaI/BamHI</i> em pET29a.	STEFANELLO, 2020.
HsGlnKDNifA	Amp	DNifA	Contém o gene <i>nifA</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>NdeI/KpnI</i> no MCSII de pETDuet-1, e o gene <i>glnK</i> de <i>H. seropedicae</i> clonado <i>XbaI/BamHI</i> no MCSI de pETDuet-1.	STEFANELLO, 2014.
pET28a	Km	-	Vetor de expressão; expressão de proteínas fusionadas a uma cauda de histidinas N-terminal a partir de um promotor <i>T7/lacO</i> .	Novagen
pEMB200	Km	pET29a	Contém o gene que codifica para GlnK de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	BONATTO <i>et al.</i> , 2007.
pETHsGlnB	Km	pET29a	Contém o gene que codifica para GlnB de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET29a.	Marco Aurélio Schuler de Oliveira, não publicado.
pGH2	Km	pET28a	Contém o gene <i>glnD</i> de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> no vetor pET28a.	BONATTO <i>et al.</i> ; 2007.

pETDuet-1	Amp	-	Vetor de expressão dual; permite a expressão de até duas proteínas, cada qual a partir de seu próprio promotor <i>T7/lacO</i> . Sítios de policlonagem denominados MCSI e MCSII.	Novagen
pAVR - 1	Km	pET28a	Contém o gene que codifica para GlnK de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> , em pET28a.	Este trabalho
pAVR - 2	Km	pET28a	Contém o gene que codifica para GlnB de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> clonado <i>NdeI/BamHI</i> em pET28a.	Este trabalho
283 – 1	Amp	pAAS1615	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 com as substituições F124L, V162A, clonado <i>XbaI/BamHI</i> em Dxho.	Adriano Alves Stefanello, não publicado.
255 – 1	Amp	pAAS1615	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 com a substituição L190P, clonado <i>XbaI/BamHI</i> em DxhoK..	Adriano Alves Stefanello, não publicado.
255 – 2	Amp	pAAS1615	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 com a substituição E185G, clonado <i>XbaI/BamHI</i> em DxhoK..	Adriano Alves Stefanello, não publicado.
255 – 3	Amp	pAAS1615	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 com as substituições I23V, E186G, K187R, clonado <i>XbaI/BamHI</i> em DxhoK	Adriano Alves Stefanello, não publicado.
255 – 5	Amp	pAAS1615	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 com a substituição L190H, clonado <i>XbaI/BamHI</i> em DxhoK..	Adriano Alves Stefanello, não publicado.
253 – 1	Amp	187 – 6	Contém o gene que codifica a quimera NifAQ6 com a substituição N136D, L194P, T341A, clonado <i>XbaI/BamHI</i> em DxhoK..	Adriano Alves Stefanello, não publicado.

4.2. MEIOS DE CULTURA

O meio de cultivo utilizado rotinamente para o crescimento das estirpes de *E. coli* e expressão heteróloga de proteínas foi o lysogeny broth (LB), composto de triptona 10g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L. Para o crescimento em meio sólido, o meio LB foi acrescido 15 g/L de ágar, gerando o meio LA. Para os ensaios de medição da atividade de β -galactosidase em *E.coli*, foi utilizado o meio mínimo NFDM (TABELA 2) (CANNON *et al.*,1974),que quando indicado foi suplementado com 20 mM de NH_4Cl e 5 ou 500 μM de IPTG.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NFDM.

NFDM	
K_2HPO_4	12,06 g/L
KH_2PO_4	3,4 g/L
MgSO_4	0,1 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025 g/L
D-glucose	20 g/L

4.3. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos utilizados para crescimento, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* contendo plasmídeos foram canamicina 50 $\mu\text{g/mL}$, ampicilina 250 $\mu\text{g/mL}$, cloranfenicol 30 $\mu\text{g/mL}$.

4.4. TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

As células competentes foram preparadas seguindo o protocolo descrito por Chung e colaboradores (1989). Para a transformação, um pré-inóculo de *E. coli* em LB foi cultivado a 37°C e 180 rpm durante a noite; cem microlitros dessa cultura foram re-inoculados em 5 mL de LB, e as células foram cultivadas a 37°C e 180 rpm por ~ 3 horas até $\text{DO}_{600} \sim 0,3$. Em seguida, alíquotas de 1 mL de cultura foram submetidas a centrifugação a 10000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 100 μL de TSS (50 mM MgCl_2 , 10% PEG8000, 5% DMSO em LB) a 0°C. O DNA de interesse previamente purificado foi adicionado à mistura de células, e a mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. Após isso, as células foram ressuspensas pela adição de 1 mL de meio SOC e recuperadas por 60 minutos a 37°C. Depois da recuperação, as células foram plaqueadas em meio LA acrescido de antibióticos.

4.5. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DE β -GALACTOSIDASE EM *E. coli*

Para a determinação da atividade de β -galactosidase, células de *E. coli* JM109(λ DE3) contendo os plasmídios codificantes para as variantes de NifA e GlnK e o plasmídeo repórter pRT22 (fusão traducional *nifH::lacZ*) foram cultivadas a 37°C, 180 rpm, por aproximadamente 12 horas. Em seguida, 50 μ L dos inóculos crescidos foram transferidos para 3 mL de NFDM acrescido de 20 mM de NH_4Cl , 3% de LB e 10% de glucose 20%, mais antibióticos. As culturas foram incubadas a 37°C, a 180 rpm, por 24 horas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas 5000 x g por 5 minutos, as células foram lavadas com 1 mL do meio NFDM, e em seguida foram inoculadas em meio NFDM suplementado com 0,02% de casaminoácidos, 5 μ M de IPTG e NH_4Cl (0 ou 20 mM).

O ensaio de β -galactosidase foi feito segundo Miller (1992), com algumas modificações. Para a reação, 100 μ L das culturas induzidas foram misturados a 900 μ L de tampão Z (8,5 3g/L Na_2HPO_4 anidro, 3,085 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/L KCl, 0,246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 390 μ L/L β -mercaptoetanol, 270 μ L SDS 10%/L) e 5 μ L de clorofórmio. Os tubos foram incubados a 30°C por 10 minutos e a reação foi iniciada pela adição de 200 μ L de orto-nitrofenil- β -galactopiranosídeo (ONPG) 4 mg/mL. Após 30 minutos de incubação, a reação foi parada pela adição de 500 μ L de Na_2CO_3 1 M. Em seguida, foram realizadas as leituras de absorbância a 415 nm (orto-nitrofenol), 550 nm (restos celulares) e 595 nm (densidade celular) das culturas.

Os cálculos de atividade foram feitos segundo a formula abaixo:

$$\text{Atividade de } \beta\text{gal} = \frac{1000(\text{DO}_{415} - 1,75(\text{DO}_{550}))}{t \times V \times \text{DO}_{595}}$$

Onde:

t= tempo de incubação (minutos);

V= volume de células utilizadas (mL);

D.O.= Absorbância no comprimento de onda indicado.

A atividade foi expressa em unidades Miller, definidas pela equação acima.

4.6. MANIPULAÇÃO DO DNA

4.6.1. Extração de DNA plasmidial

As bactérias foram crescidas em meio LB contendo antibiótico a 37°C sob agitação de 120 rpm por 16 horas. Para extração do DNA plasmidial, 1,5 mL de cultura foram centrifugados

em tubos de polipropileno em microcentrífuga a 14500 rpm por 30 segundos. O sobrenadante foi ressuspenso em 200 μ L de GET (50 mM glucose, 100 mM EDTA, 25 mM Tris- HCl pH 8,0). Em seguida foi adicionado 200 μ L de tampão lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%), e a lise foi interrompida após poucos segundos pela adição de 200 μ L de Kacf (Acetato de Potássio 3 M, Ácido fórmico 1,8 M). A suspensão resultante foi centrifugada por 5 minutos, o sobrenadante recuperado e a ele adicionado 200 μ L de solução clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada rapidamente e centrifugada por 5 minutos, e em seguida a fase aquosa transferida para um novo tubo. O DNA plasmidial foi precipitado pela adição de 0,6 vezes volumes de isopropanol, seguido de centrifugação por 10 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70%, centrifugado por 10 minutos a 14500 rpm, seco em estufa e ressuspendido em água estéril.

4.6.2. Eletroforese de DNA

Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1%) (m/v) em tampão BE (borato de sódio 5mM; EDTA 0,5 mM). As amostras foram aplicadas no gel e submetidas a 40 V por 1 hora e 30 minutos; em seguida, o gel foi incubado com brometo de etídeo 0,002%, e visualizado sob luz UVC (254 nm). O perfil eletroforético foi registrado em um aparelho 3UVTM Transiluminator (UVP).

4.6.3. Clonagem de DNA

Para obter as proteínas GlnK e GlnB sendo expressas com cauda de histidina na região N-terminal, foi necessário realizar uma subclonagem dos genes *glnB* e *glnK* no vetor pET28a. Para isso, os plasmídeos pETHsGlnB e pEMB200 foram clivados com 2 unidades de endonucleases de restrição, *NdeI* e *HindIII* (NEB, Thermo Fisher Scientific), na presença do tampão Tango 2x (Thermo Fisher Scientific), em um volume final de reação de 10 μ L. As reações foram incubadas durante 3 horas a 37°C. Para inativar as enzimas, os sistemas foram aquecidos a 80°C por 20 minutos. Os fragmentos digeridos foram ligados ao vetor pET28a digerido com *NdeI* e *HindIII*, utilizando a enzima T4 DNA ligase, em uma reação contendo 1 μ L da reação de restrição do inserto, e 0,5 μ L de vetor, em um volume final de 10 μ L. As reações foram incubadas a 18°C *overnight*, e em seguida transformadas em *E. coli* TOP10.

4.6.4. Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi utilizado para confirmar os clones positivos. O método utilizado foi o de terminação de cadeia, desenvolvido por Sanger *et al.* (1977). Os

dideoxiribonucleotídeos terminadores de cadeia foram marcados com fluorescência (PROEBER *et al.*, 1987). O sistema de reação para o sequenciamento está descrito na tabela 3.

TABELA 3 - SISTEMA DE REAÇÃO PARA SEQUENCIAMENTO DE DNA.

Reagente	Quantidade (μL)
Sequencing buffer 5x (Applied Biosystems)	2
Sequencing mix BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)	0,7
Primer	0,7
DNA plasmidial	0,5
Água ultrapura	6,1

O programa de amplificação utilizado para reação de sequenciamento foi 95°C por 1 minuto, 30 ciclos de extensão (96°C 15 s, 50°C 15 s, 60°C 4 min), e extensão final de 60°C por 1 minuto. O produto dessa reação foi purificado através da adição de 10 μL de água ultrapura, 2 μL de acetato de amônio 7,5 M, 65 μL de etanol absoluto, após a espera de 20 minutos, a reação foi submetida a centrifugação por 20 minutos a 14000 rpm, o sobrenadante foi descartado e lavado com 100 μL de etanol 70%. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* secado, e seguida ressuspendido em tampão de corrida (Life Technologies). O sequenciamento foi analisado pelo sequenciador ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4.7. MANIPULAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.7.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)

As eletroforeses de proteína em gel Tris-glicina foram realizadas em gel de poliacrilamida desnaturante. A concentração do gel separador utilizado em todas as eletroforeses foi de 15% (m/v) e do gel de empilhamento foi de 4%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo a orientação do fabricante (Biorad). As amostras foram misturadas com tampão de amostra (2% de SDS, 10% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol, 0,0625 mol/L de Tris-HCl pH 6,8, 5% de β-mercaptoetanol) e fervidas antes da aplicação. A voltagem da corrida foi de 140 V, utilizando o tampão Laemmli (3 g/L de Tris-base, 14 g/L de Glicina e 1g/L de SDS). Após a eletroforese, as proteínas do gel foram coradas com corante Coomassie Blue R-250 e descoradas em uma solução com 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético.

TABELA 4- COMPOSIÇÃO DOS GÉIS SDS-PAGE

Gel separador (15%)	Gel de empilhamento (4%)
---------------------	--------------------------

H ₂ O	3,645 mL	H ₂ O	3,162 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,3 mL
SDS 10%	100 µL	SDS 10%	50 µL
Acrilamida:bisacrilamida 29:1	3,75 mL	Acrilamida:bisacrilamida 29:1	487,5 µL
40%		40%	
APS 10%	100 µL	APS 10%	50 µL
TEMED	5 µL	TEMED	10 L

4.7.2. Eletroforese não desnaturante de proteínas

A eletroforese não desnaturante de proteínas foi realizada conforme descrito por Forchhammer e Marsac (1994) com algumas modificações. A concentração do gel separador e de empilhamento foi de 7,5%. As eletroforeses foram realizadas em sistema vertical seguindo a orientação do fabricante (Biorad). As amostras foram misturadas a glicerol (25%) para aplicação. As corridas foram feitas por 4 horas a 10 mA, 100 V, utilizando o tampão de corrida que continha 3 g/L e 14,4 g/L glicina. As composições dos géis estão descritas na tabela abaixo:

TABELA 5- COMPOSIÇÃO DOS GÉIS NÃO DESNATURANTE DE PROTEÍNAS.

Gel separador (7,5%)		Gel de empilhamento (7,5%)	
H ₂ O	3 mL	H ₂ O	2 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3 mL	Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	0,5 mL
Nonidet 40 (0,25%)	1 mL	Nonidet 40 (0,25%)	0,5 mL
Acrilamida:bisacrilamida 29:1	3 mL	Acrilamida:bisacrilamida 29:1	1 mL
40%		40%	
APS 10%	100 µL	APS 10%	40 µL
TEMED	10 µL	TEMED	10 L

4.7.3. Expressão heteróloga das proteínas PII

Os plasmídeos pAVR-1, pAVR-2, pETHsGlnB, pEMB200, foram transformados na estirpe BL21(λDE3) de *E. coli*. Os transformantes foram inoculados em meio LB e multiplicados a 37°C até uma DO₆₀₀ 0,5-0,6. Nesse ponto foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,5 mM. A expressão prosseguiu durante 3 horas a 30°C. Em seguida, as células foram

coletadas por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e lisadas por sonicação em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM, KCl, 1 mM de EDTA pH 8,0, 20% glicerol). A expressão das proteínas de interesse foi avaliada em gel de poliacrilamida 15%.

4.7.4. Expressão heteróloga proteína NifAQ6

Células de *E. coli* JM109(γ DE3) pRT22 contendo os plasmídeos, que codificam para a variante de NifAQ6, foram inoculadas em meio LB e multiplicadas a 37°C até uma DO₆₀₀ 0,5-0,6. Nesse ponto foi adicionado o indutor de expressão IPTG (Isopropil β - D-1-tiogalactopiranosídeo) nas concentrações finais de 0 μ M, 5 μ M, 20 μ M, 100 μ M e 500 μ M. A expressão foi obtida mediante incubação durante 3 horas a 30°C ou 16 horas a 18°C. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e lisadas por sonicação em tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, e 20% glicerol). A expressão das proteínas de interesse foi avaliada em gel de poliacrilamida 15%.

4.7.5. Expressão heteróloga da proteína GlnD

O plasmídeo pGH2 foi transformado na estirpe BL21(Δ DE3) de *E. coli*. O transformante foi inoculado em meio LB e multiplicados a 37°C até uma DO₆₀₀ 0,5-0,6. Nesse ponto foi adicionado o indutor de expressão IPTG na concentração final de 0,5 mM. A expressão prosseguiu durante 16 horas a 16°C. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 3000 x g durante 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O sobrenadante foi removido e as células ressuspensas e lisadas por sonicação em tampão PD1 (50mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM de imidazol e 10% glicerol). A expressão da proteína de interesse foi avaliada em gel de poliacrilamida 15%.

4.7.6. Purificação das proteínas PII nativas

As purificações das proteínas PII nativas foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Moure *et al.*, (2011) com algumas modificações. Após a superexpressão de GlnK e GlnB a partir dos plasmídeos pEMB200 e pETHsGlnB, respectivamente, as células coletadas por centrifugação foram ressuspensas em solução salina com 200 mM de NH₄Cl e incubadas no gelo por 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos, 3000 x g, a 4°C. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuspendido em tampão gelado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM, EDTA 1 mM e 20% de glicerol) e sonicado em banho de gelo. Como primeira etapa

de purificação, o extrato bruto foi incubado em banho maria a 70°C por 15 minutos, seguido de banho de gelo por mais 15 minutos. O extrato bruto foi centrifugado a 15000 x g, por 30 minutos a 4°C, para obtenção da fração solúvel. A fração solúvel foi injetada na coluna Hi-Trap Heparin (GE Healthcare) de 1 mL, pré-equilibrada com tampão APII (50 mM Tris – HCl pH 7,5 e 100 mM de KCl), em seguida a coluna foi lavada com 5 mL de tampão APII. A eluição foi realizada em um gradiente de KCl, onde foi coletado frações de 1 mL, com 10, 20, 30, 50 e 100% de tampão BPII (50 mM Tris – HCl pH 7,5 e 1M de KCl).

A fim de obter uma fração de proteína mais pura o possível, as frações em que as proteínas de interesse foram eluídas e injetadas na coluna Hi-Trap QFF (GE Healthcare) de 1 mL, pré-equilibrada com tampão A-hep (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl, 10% glicerol). Em seguida, a coluna foi lavada com 5 mL de tampão A-hep. A eluição foi realizada em um gradiente de KCl, onde foi coletado frações de 1 mL, com 10, 20, 40 e 100% de tampão B-hep (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1M KCl, 10% de glicerol). As frações com proteína purificada foram juntadas e dialisadas contra o tampão com 50 mM de Tris-HCl, 200 mM de KCl e 50% de glicerol. As proteínas assim obtidas foram armazenadas em refrigerador a -20°C até a hora do uso.

4.7.7. Purificação das proteínas PII com cauda de histidina

Após a superexpressão de GlnK e GlnB a partir dos plasmídeos pARV – 1 e pARV – 2, respectivamente, as células coletadas por centrifugação foram ressuspensas em tampão APH (50 mM Tris-HCl 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol) gelado e sonicado em banho de gelo. Os extratos de proteínas obtidos após a sonicação foram centrifugados a 15000 x g por 30 minutos a 4°C, e os sobrenadantes resultantes foram considerados as frações solúveis. Os sobrenadantes foram injetados em uma coluna Hi-Trap-Chelating (GE Healthcare) carregada com níquel e equilibrada com o tampão APH, em seguida a coluna foi lavada com 5 mL de tampão A. A eluição foi realizada em um gradiente de imidazol, coletando frações de 1 mL, com 10%, 20%, 40% e 100% de tampão BPH (50 mM Tris-HCl 8,0, 200 mM NaCl, 10% glicerol e 1M de Imidazol). As proteínas purificadas foram dialisadas contra o tampão de diálise DPH (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl e 50% glicerol), e em seguida armazenadas em refrigerador a -20°C até a hora do uso.

4.7.8. Purificação de GlnD

Após a superexpressão de GlnD a partir do plasmídeo pGH-2 as células coletadas por centrifugação foram ressuspensas em tampão PD1 (50 mM Tris-HCl 8,0, 200 mM NaCl, 10% glicerol) gelado e sonicado em banho de gelo. O extrato de proteínas obtido após a sonicação

foi centrifugado a 15000 x g por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante resultante foi considerado a fração solúvel. O sobrenadante foi então injetado em uma coluna Hi-Trap-Chelating (GE Healthcare) carregada com níquel e equilibrada com o tampão PD1, em seguida a coluna foi lavada com 5 mL de tampão PD1. A eluição foi realizada em um gradiente de imidazol, coletando frações de 1 mL, com 10%, 20%, 40% e 100% de tampão PD2 (50 mM Tris-HCl 8,0, 500 mM NaCl, 10% glicerol e 1M de Imidazol). A proteína purificada foi dialisada contra o tampão PD3 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl e 50% glicerol), e em seguida armazenada em refrigerador a -20°C até a hora do uso.

4.7.9. Purificação de NifAQ6

A fração solúvel contendo a proteína NifAQ6 superexpressa foi injetada manualmente em coluna Hi-trap Chelating 1 mL carregada com íons Co^{2+} e pré- equilibrada com tampão A-co (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de KCl, 10% de glicerol). A coluna foi então lavada com 5 mL de tampão A-co e eluída com um gradiente em degraus de 10, 20, 40, 100% de tampão B-co (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 200 mM de KCl, 10% glicerol, 1 M imidazol), coletando frações de 1 mL. A fim de obter uma proteína mais pura, as frações enriquecidas para a proteína de interesse foram reunidas e injetadas manualmente em colunas HiTrap Heparin ou HiTrap QFF FF (GE Healthcare), ambas de 1 mL, equilibradas previamente com o tampão A-hep (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM KCl e 10% de glicerol). O gradiente de eluição foi feito em degraus de 5, 10, 20, 100% de tampão B-hep (50 Mm Tris-HCl Ph 8,0, 1M KCl, 10% glicerol). As frações foram coletadas a cada 1 mL. Também foram testadas duas colunas de interação hidrofóbica a HiTrap Phenyl FF e a HiTrap Octyl FF (GE Healthcare) de 1 mL; nesse caso, as colunas foram pré – equilibradas com tampão B-hep, e a eluição foi feita em um gradiente em degraus de 5, 10, 20 e 100% de tampão A-hep. Todas as frações obtidas foram avaliadas em eletroforese desnaturante de proteínas.

4.7.10. Ensaios de co – precipitação (*pull – down*)

Os ensaios de *pull-down* foram realizados utilizando o kit Promega MagneHis (cat. No. V8500). Nesses ensaios foram incubados com a MagneHis, 30 – 50 µg de his - GlnK ou his-GlnB e 200 µL de fração solúvel obtida a partir da superexpressão dos plasmídeos que possuem variantes de NifAQ6. O tempo de interação foi de 10 minutos, na presença de 100 µL tampão A-co (50 mM Tris-HCl PH 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol, 0,05% LDAO, 8 mM MgCl_2), com os efetores de PII (10 µM e 2 mM 2-OG, 3 mM ATP, ou 3 mM ADP). As lavagens foram feitas com 100 µL de tampão A-co, na presença dos efetores. As eluições foram feitas com

50 µL tampão B-co (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 10% glicerol, 1M imidazol), durante 5 minutos. As amostras coletadas foram analisadas através da eletroforese desnaturante de proteínas.

4.7.10.1. Quantificação do sinal de NifAQ6

Nos ensaios de *pull-down* a quantificação do sinal de NifAQ6 foi realizada por densitometria, através do programa GelAnalyzer (19.1). Na análise das imagens, as linhas foram selecionadas e os volumes relativos das bandas foram calculados. Esse volume foi expresso em unidades arbitrárias e os valores foram mostrados em um gráfico de coluna para a comparação.

4.7.11. Uridililação das PII

O ensaio de uridililação das proteínas PII foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Bonatto *et al.*, (2007), com modificações. Este ensaio consistiu na incubação, por 16 horas a 30°C, das proteínas his-GlnD (1 µM) com his-GlnK ou his-GlnB (100 µM), na presença do tampão de uridililação (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl, 25 mM MgCl₂) acrescido de 0,2 mM ATP, 5 mM 2-OG e 5 mM UTP. A proteína GlnD foi inativada através da incubação da reação a 70°C por 15 minutos. A uridililação das PII foi avaliada através de eletroforese de proteínas não desnaturante.

5. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

A estratégia experimental utilizada neste trabalho está descrita na figura abaixo (figura 2).

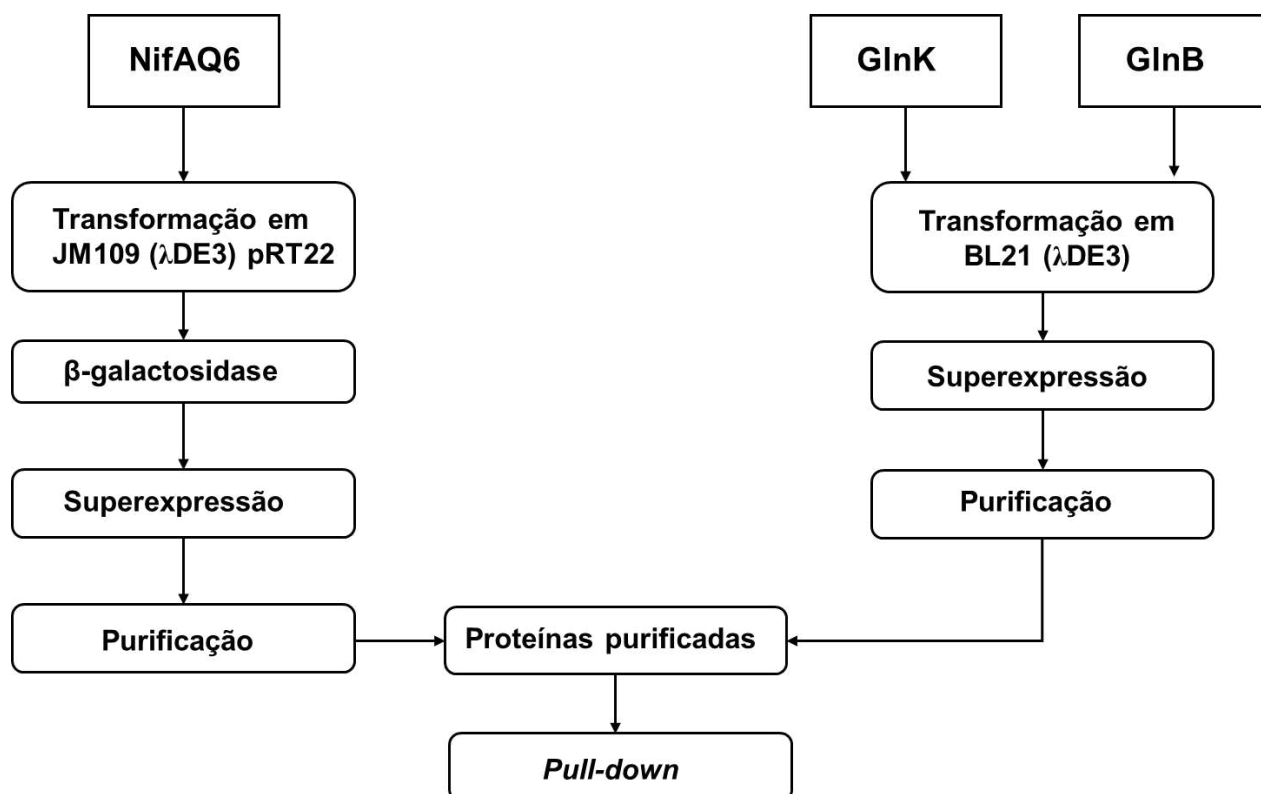


FIGURA 2- ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ATIVIDADE DE NifAQ6 *in vivo*

Com objetivo de garantir que a proteína NifAQ6, que foi posteriormente expressa e purificada (itens 6.4 e 6.5), mantém sua atividade na ausência de oxigênio, mantém a inibição pelo domínio GAF na ausência de PII e ativação dependente de PII foi realizado o ensaio de β – galactosidase para medir atividade *in vivo* de NifAQ6. Nesse ensaio utilizou-se um sistema desenvolvido por Stefanello *et al.* (2019) que permite a co – expressão de GlnK e NifA de *H. seropedicae* em *E. coli*. Neste ensaio, os plasmídeos pAAS1637 (expressa GlnK e NifAQ6), pAAS1632 (expressa NifAQ6), DNifA (expressa NifA de *H. seropedicae*), DN185 (expressa NifA (Δ1-185) de *H. seropedicae*), HsGlnKDNifA (expressa GlnK e NifA de *H. seropedicae*), foram transformados em *E. coli* JM109 (λDE3) contendo o plasmídeo–repórter pRT22 (fusão *nifH::lacZ*). O experimento de β-galactosidase ocorreu como descrito na seção 4.5 e os resultados são mostrados na figura 2.

Os resultados observados na figura 2, permitem concluir que a quimera NifAQ6, expressa a partir do plasmídeo pAAS1637, possui uma capacidade de ativação transcricional relativamente alta do promotor *nifH* na presença de oxigênio, sendo essa ativação dependente da proteína GlnK. Esse resultado já foi relatado por Stefanello (2018). Na presença de amônio a ativação transcricional é inibida, já que o domínio N- terminal, que responde ao status de nitrogênio (MONTEIRO *et al.*, 1999b, 2001) permanece intacto. Quando a NifAQ6 não é co-expressa com GlnK (pAAS1632), há pouca ativação na ausência de amônio, o que reforça o fato de GlnK ser necessária para ativação de NifA na ausência de amônio. A proteína NifA de *H. seropedicae*, mesmo sendo expressa juntamente com GlnK (HsGlnKDNifA) não apresenta atividade na ausência de amônio devido a sua sensibilidade a oxigênio. Assim como a versão N-truncada que não seria regulada por amônio NifA(Δ 1-185) (DN185). A proteína NifA de *H. seropedicae*, expressa a partir do plasmídeo DNifA, além de ser incapaz de ser ativa na ausência de PII, também possui sensibilidade a oxigênio.

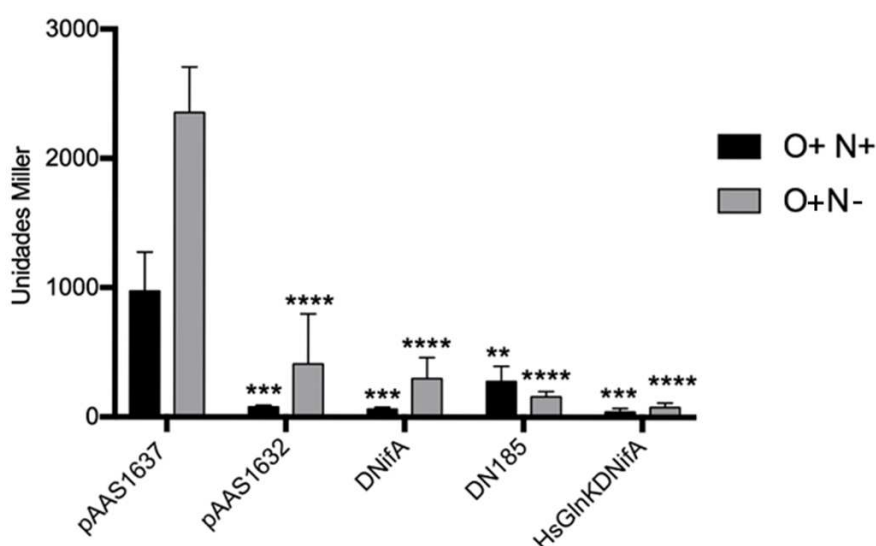


FIGURA 3- ATIVIDADE DE β – GALACTOSIDASE DE CÉLULAS EXPRESSANDO A PROTEÍNA NifA. Esse gráfico corresponde à média de três experimentos. As diferenças estatísticas entre pAAS1637 e os controles estão representados com (**) $p < 0,005$; (***) $p < 0,0001$; (****) $p < 0,001$.

6.2. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS PII

6.2.1. Expressão e purificação das proteínas PII nativas

As expressões das proteínas PII foram realizadas conforme descrito no item 4.7.3. Após a sonicação, os extratos brutos de células foram submetidos a centrifugação a 15000 x g, a 4°C, durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram considerados como frações solúveis, enquanto os

pellets, como frações insolúveis. Para verificação da expressão das proteínas nos extratos e frações, uma amostra de 5 μ L de cada foi analisada por SDS-PAGE 15%. A figura 3 mostra que tanto GlnB (12,3 kDa) quanto GlnK (12,2 kDa) são superexpressas em BL21 (Δ DE3) e majoritariamente solúveis.

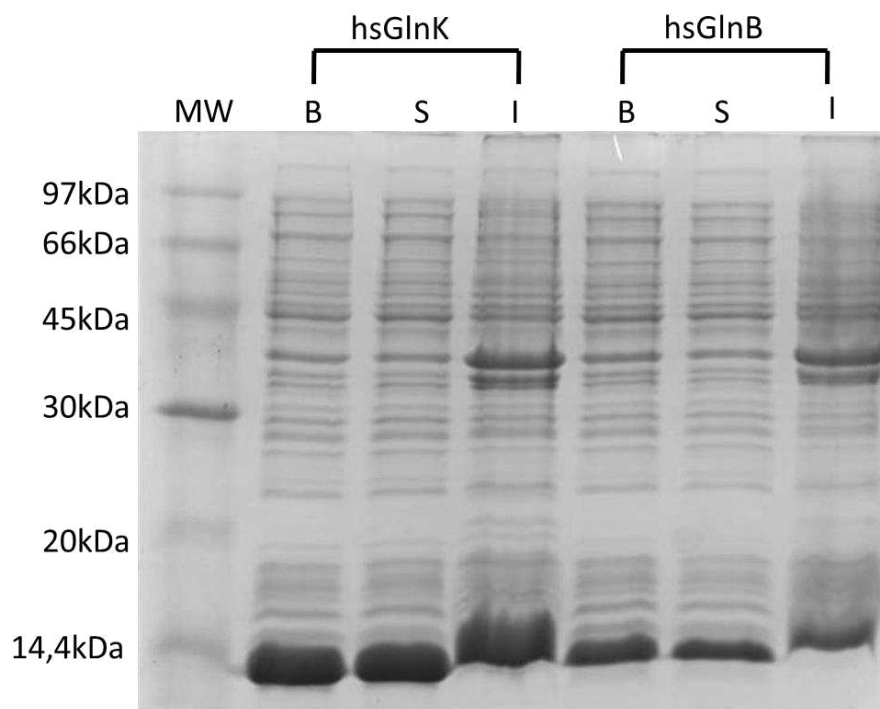


FIGURA 4- EXPRESSÃO DE GlnK e GlnB. MW é o marcador de peso molecular (kDa). B refere-se ao extrato bruto, S corresponde a fração solúvel e I a fração insolúvel.

6.2.1.1. Purificação de GlnB

A purificação de GlnB foi realizada em duas etapas. Na primeira a fração solúvel foi injetada em uma coluna HiTrap Heparin 1 mL carregada com tampão APII. As proteínas não ligadas à coluna e a fração resultante da lavagem da mesma com tampão APII foram coletadas separadamente. Frações enriquecidas com GlnB foram eluídas ao longo de todo o gradiente de tampão BPPII (figura 4).

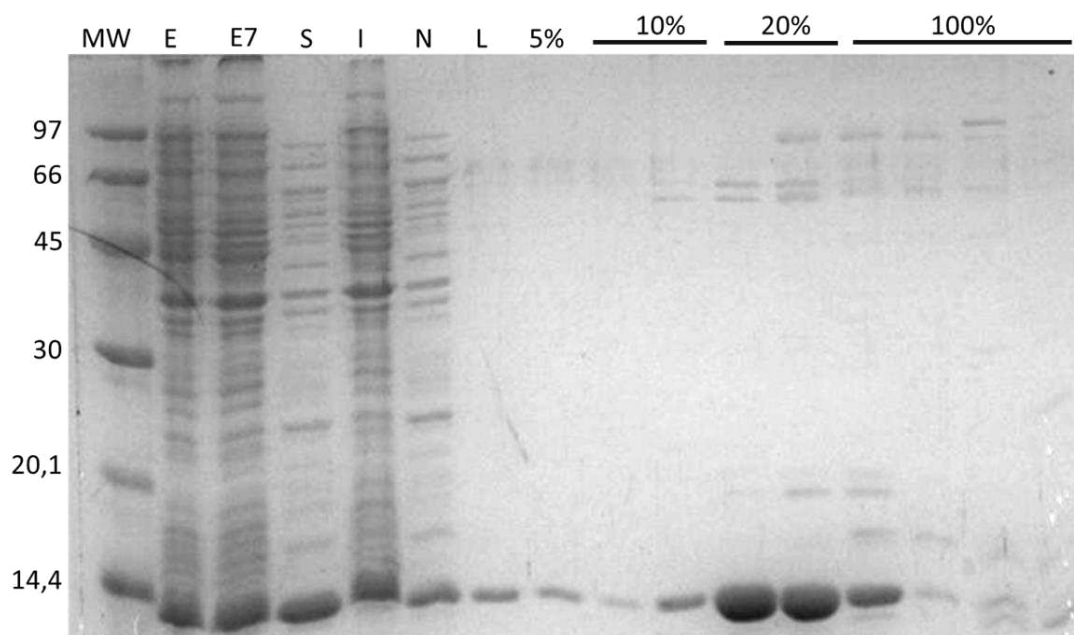


FIGURA 5- PURIFICAÇÃO GlnB EM COLUNA DE HEPARINA. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). E, extrato, E7, extrato após a incubação a 70°C, S, fração solúvel, I, fração insolúvel, N, proteínas não ligadas na coluna, L, lavagem com tampão APII (5 mL), 5, 10, 20 e 100% se referem a concentração de tampão BPII utilizada para a eluição em degraus. As frações foram eluídas em volumes diferentes (5 mL para 5%, 2 mL para 10 e 20% e 4 mL para 100%). Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

A fim de obter uma amostra de GlnB livre de contaminantes, deu-se início a uma segunda etapa de purificação. Para isso, as frações eluídas com 20% de tampão BPII, mais a primeira fração eluída com 100% de tampão BPII, foram juntadas e diluídas até a concentração de sal chegar a 200 mM. Em seguida a amostra foi injetada na coluna de troca iônica HiTrap QFF previamente carregada com tampão A-hep. A eluição foi feita em gradiente em degraus de KCl, utilizando tampão B-hep (figura 5).

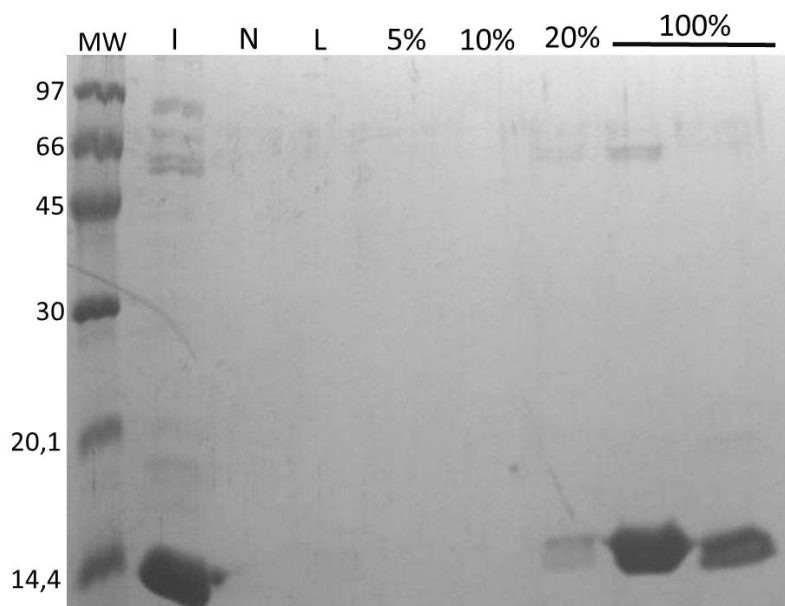


FIGURA 6- PURIFICAÇÃO de GlnB EM COLUNA DE TROCA IÔNICA. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). I, proteínas injetadas, N, proteínas não ligadas, L, lavagem com 5 mL de Tampão A-hep. 5, 10, 20 e 100% correspondem as porcentagens de tampão B-hep utilizadas para eluir cada fração. Os volumes de eluição das frações são diferentes (5 mL para 5%, 1 mL para 10 e 20%, 2 mL para 100%). Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

Apesar de alguns contaminantes terem permanecido, os 2 mL eluídos com 100% de tampão B, foram juntados e dialisados. Depois disso, a proteína pura foi estocada em refrigerador a -20°C , até o momento do uso.

6.2.1.2. Purificação de GlnK

Para a purificação de GlnK, a fração solúvel foi injetada em uma coluna HiTrap Heparin 1 mL carregada com tampão APII. A fração de proteínas que não se ligaram à coluna foi coletada, assim como a lavagem e as frações eluídas em um gradiente em degraus de tampão BPPII (figura 6). As frações que correspondem à lavagem, 5% de tampão B, e à primeira fração da eluição com 10% do tampão BPPII, foram unidas e dialisadas. Após a diálise a proteína GlnK pura foi armazenada em refrigerador a -20°C .

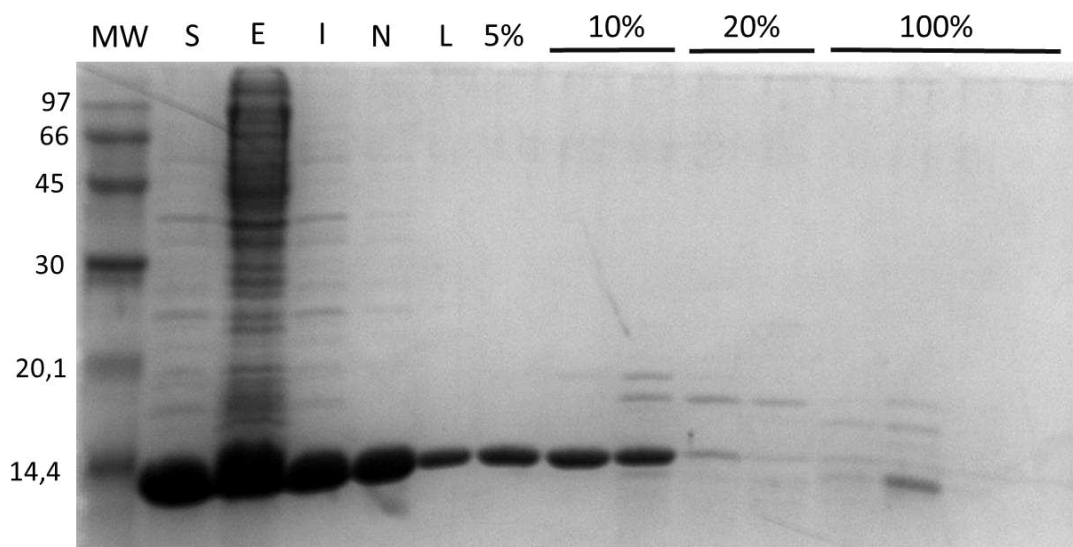


FIGURA 7 - PURIFICAÇÃO de GlnK EM COLUNA DE HEPARINA. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). S, proteínas solúveis, E, extrato bruto, I, proteínas insolúveis, N, proteínas que não se ligaram a coluna, L, lavagem com 5 mL de tampão APII. 5, 10, 20 e 100% correspondem as frações eluídas com tampão BPII. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 ml para lavagem, 5 mL para 5%, 2 mL para 10 e 20% e 4 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

6.2.2. Expressão e purificação das proteínas PII com cauda de histidina

6.2.2.1. Expressão e purificação de his – GlnB

Para a purificação de his-GlnB (13,08 kDa), a fração solúvel obtida por centrifugação foi injetada em coluna HiTrap Chelating carregada com íons Ni^{++} e equilibrada com tampão APH. A coluna foi lavada com 5 mL de tampão APH, seguido da eluição com gradiente de imidazol. A eluição foi realizada em degraus com 10, 20, 40 e 100% de tampão BPH. Cinco microlitros de cada fração foram submetidos a SDS-PAGE (figura 7). As frações 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, que foram enriquecidas com his-GlnB, foram unidas e dialisadas contra o tampão DPH. Após a diálise, his-GlnB foi armazenada a -20°C até a hora do uso.

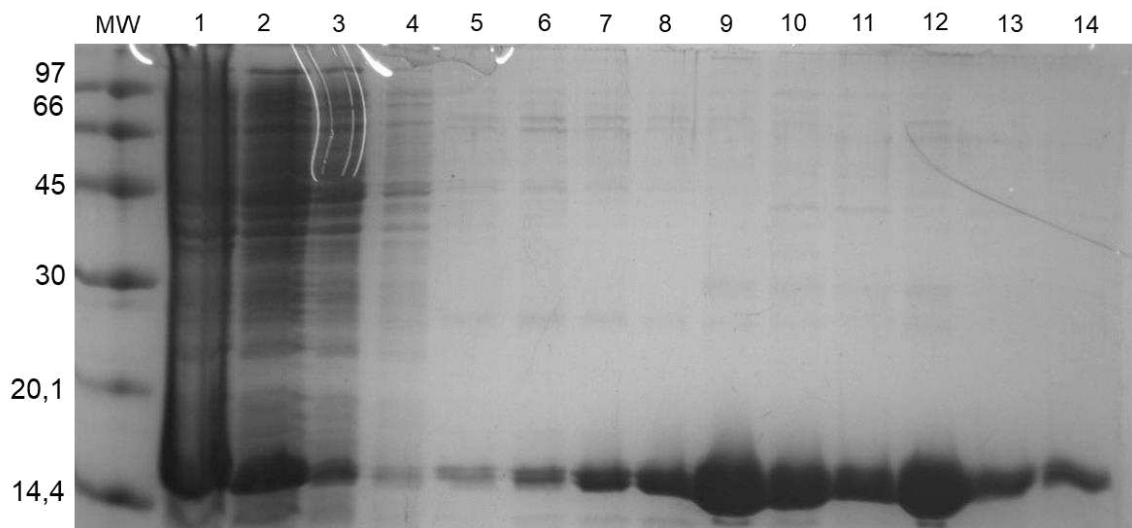


FIGURA 8- PURIFICAÇÃO DE his - GlnB EM COLUNA DE ÍONS NÍQUEL. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). As linhas 1 a 4 correspondem respectivamente ao extrato bruto, fração solúvel, proteínas não ligadas na coluna e lavagem com tampão APh. As linhas 5 e 6 correspondem as frações eluídas com 10% do tampão BPH. As linhas 7 e 8 são as frações eluídas com 20% de tampão BPH. As linhas 9 e 10 são as frações eluídas com 40% de tampão BPH. As últimas linhas correspondem as frações eluídas com 100% de tampão BPH. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 mL para lavagem, 5 mL para 5%, 2 mL para 10 e 20% e 4 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

6.2.2.2. Expressão e purificação de his – GlnK

O procedimento de purificação de his-GlnK (13,03 kDa) foi idêntico ao de de his-GlnB. A fração solúvel obtida por centrifugação foi injetada em coluna HiTrap Chelating carregada com íons Ni^{++} e equilibrada com tampão APh. A coluna foi lavada com 5 mL de tampão APh, seguido da eluição com gradiente de imidazol. A eluição foi realizada em degraus com 10, 20, 40 e 100% de tampão BPH. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados em gel de poliacrilamida desnaturante e submetidos a eletroforese (figura 8). Neste caso, as frações escolhidas para serem unidas e dialisadas contra o tampão DPH foram as 10, 11, 12, 13, 14 e 15.

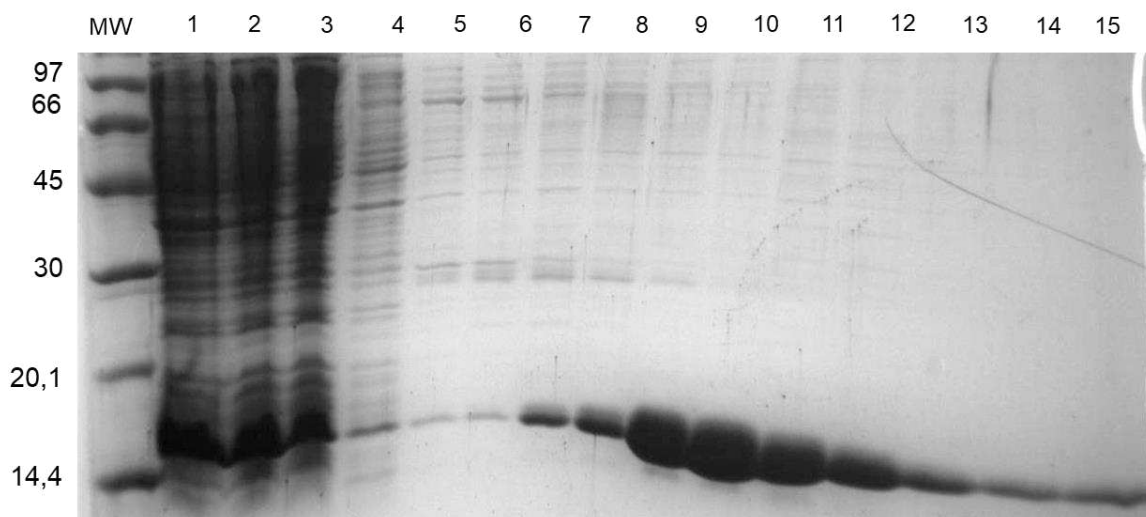


FIGURA 9 - PURIFICAÇÃO DE his-GlnK EM COLUNA DE ÍONS NÍQUEL. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). As linhas 1 a 5 correspondem respectivamente ao extrato bruto, fração solúvel, fração insolúvel, proteínas não ligadas na coluna e lavagem com tampão APH. As linhas 6 e 7 correspondem as frações eluídas com 10% do tampão BPIIH. As linhas 8 e 9 são as frações eluídas com 20% de tampão BPH. As linhas 10 e 11 são as frações eluídas com 40% de tampão BPH. As últimas linhas correspondem as frações eluídas com 100% de tampão BPH.

6.3. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA GlnD

A purificação da proteína GlnD (96,96 kDa) foi realizada como descrito no item 4.7. 8. A proteína não parece ter sido expressa em grandes quantidades e a purificação não resultou em frações totalmente puras. No entanto, o grau de purificação obtido já é o suficiente para o ensaio de uridililação. A eluição foi feita em degraus, com 10, 20, 40 e 100% de tampão PD2. E as frações de 10% e a primeira fração eluída com 20% foram unidas e dialisadas contra o tampão PD3. Após a diálise a proteína pura foi armazenada em refrigerador a -20°C até o momento do uso (figura 9).

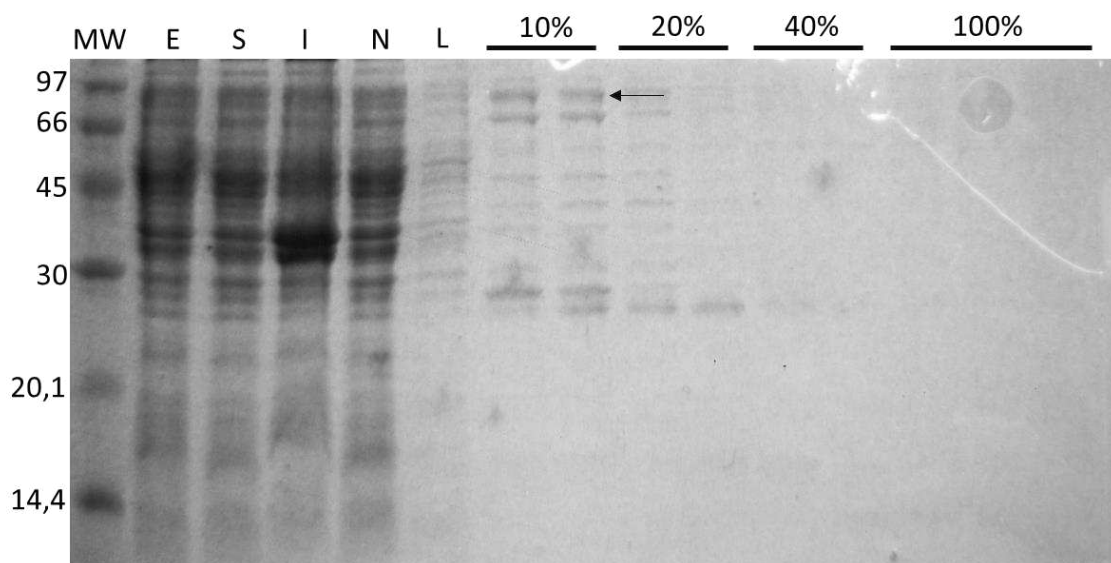


FIGURA 10- PURIFICAÇÃO de GlnD EM COLUNA CARREGADA COM ÍONS NÍQUEL. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). S, proteínas solúveis, E, extrato bruto, I, proteínas insolúveis, N, proteínas que não se ligaram a coluna, L, lavagem com 5 mL de tampão PD1. 10, 20, 40 e 100% correspondem as frações eluídas com tampão PD. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 ml para lavagem, 2 mL para 10, 20 e 40% e 4 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

6.4. TESTES DE EXPRESSÃO DE NifAQ6 em JM109 (λ DE3) pRT22

A expressão de NifAQ6 em *E. coli* a partir de pAAS1637 foi realizada em meio LB na presença de antibióticos. Após a indução com 0,5 mM de IPTG, a 30°C por 3 horas, as células de *E. coli* JM109(λ DE3) sem plasmídeo e células contendo pRT22 e pAAs1637 foram ressuspensas em tampão de ressuspensão (50 mM de Tris- HCl pH 7,5; 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM de ATP, 5 mM 2OG). Uma alíquota de extrato bruto foi reservada, e as frações solúvel e insolúvel foram obtidas por centrifugação do extrato bruto por 30 minutos a 15000 x g a 4°C. Para a verificação da expressão das proteínas nos extratos e frações, cinco microlitros de proteínas foram aplicados em gel SDS-PAGE. O gel resultante é mostrado na figura 10. A figura 10 mostra que tanto NifAQ6 quanto GlnK foram superexpressas em *E. coli* JM109(λ DE3) pRT22, a partir do plasmídeo pAAS1637.

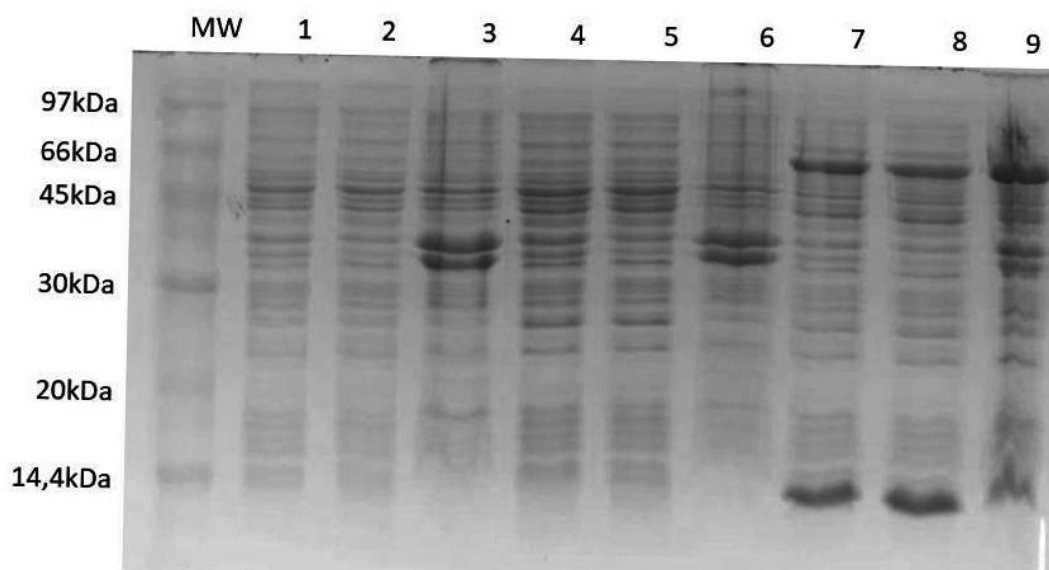


FIGURA 11 - TESTE DE EXPRESSÃO DE NifAQ6 em *E. coli* JM109(λ DE3) pRT22. A linha MW contém o marcador de massa molecular com as respectivas massas em kDa indicadas à esquerda. As linhas 1, 2 e 3 contêm, respectivamente, o extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel da estirpe de *E. coli* JM109 (λ DE3). As linhas 4, 5 e 6 contêm, respectivamente, o extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel da JM109 (λ DE3), contendo o plasmídeo pRT22. As linhas 7, 8 e 9 contêm o extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel de JM109 (λ DE3) pRT22, transformado com o plasmídeo pAAS1637.

Visto que uma parcela da proteína se encontra na fração insolúvel, foi investigado se outras concentrações de indutor poderiam aumentar a solubilidade da mesma. A indução foi feita a 30°C por 3 horas, com 0 μ M, 5 μ M, 20 μ M, 100 μ M, 500 μ M de IPTG. A coleta do extrato bruto e das frações solúveis foi feita da mesma forma descrita anteriormente. O resultado está apresentado na figura 11. Neste teste, foi visto que nas concentrações de 100 μ M e 500 μ M a proteína apresenta uma solubilidade parecida, portanto para as expressões em volume maior, destinadas a purificação, as proteínas foram expressas com 100 μ M de IPTG.

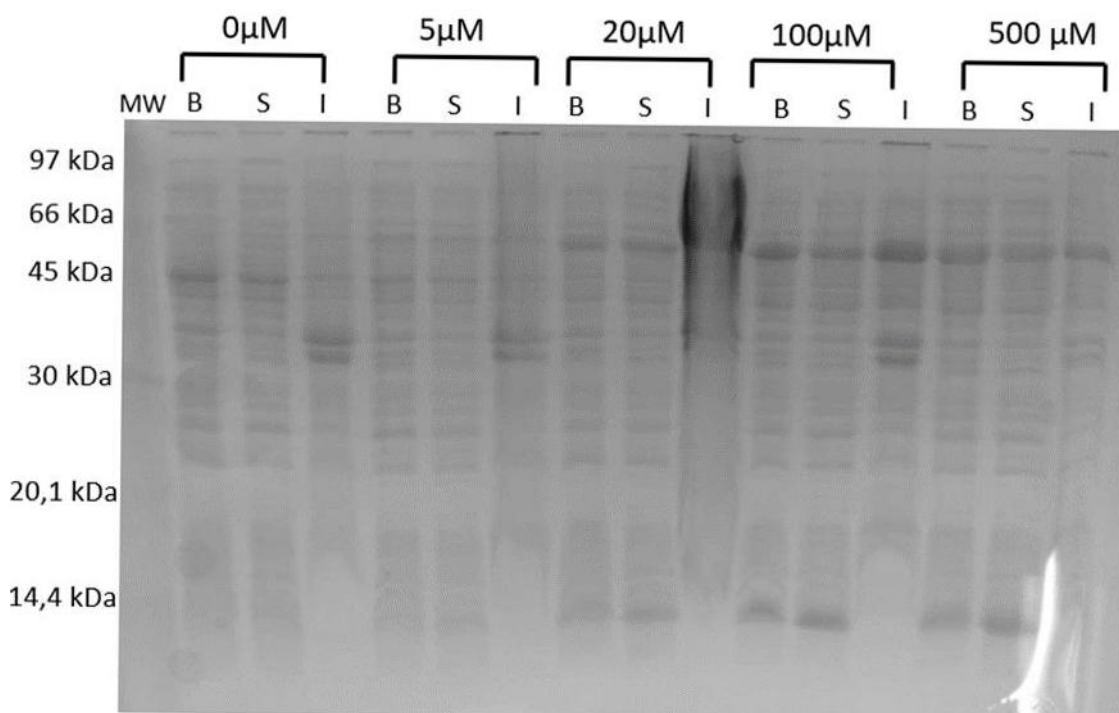


FIGURA 12 - TESTE DE EXPRESSÃO DE NifAQ6 EM DIFERENTE CONCENTRAÇÕES DE IPTG. A linha 1 contém o marcador molecular com as respectivas massas em kDa indicadas à esquerda. As letras B, S e I, correspondem respectivamente ao extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel.

6.5. PURIFICAÇÃO DE NifAQ6

Após as melhores condições para superexpressão de NifAQ6 (59,74 kDa) serem determinadas, a expressão em larga escala para purificação passou a ser feita com 100 μ M de IPTG a 30°C por 3 horas, em 400 mL de cultura. A cultura foi centrifugada e o *pellet* ressuspensionado em tampão A – co para a sonicação em banho de gelo. A fração solúvel obtida através da lise celular por sonicação e centrifugação a 15000 x *g* por 30 minutos, a 4°C, foi injetada em uma coluna Hitrap Chelating 1 mL carregada com íons Co^{2+} e equilibrada com tampão A–co. As proteínas não ligadas à coluna e a fração resultante da lavagem da mesma com tampão A–co foram coletadas separadamente. Frações enriquecidas com NifAQ6 foram eluídas ao longo de todo o gradiente de tampão B–co (figura 12).

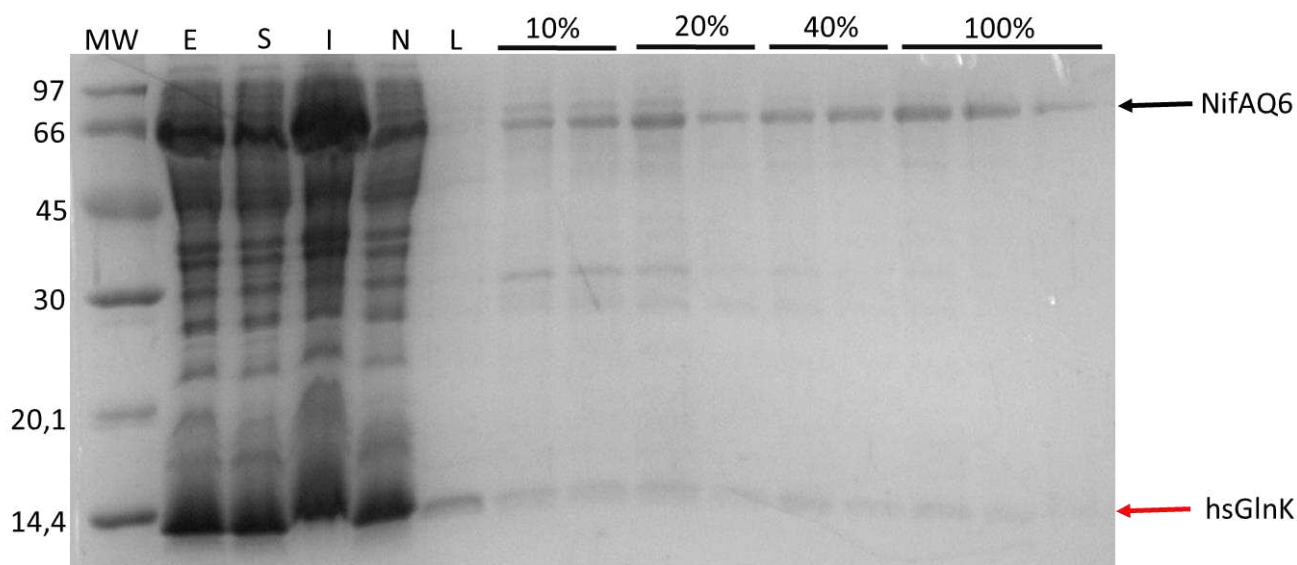


FIGURA 13-PURIFICAÇÃO de NifAQ6 EM COLUNA CARREGADA COM ÍONS COBALTO. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). S, proteínas solúveis, E, extrato bruto, I, proteínas insolúveis, N, proteínas que não se ligaram a coluna, L, lavagem com 5 mL de tampão A-co. 10, 20, 40 e 100% correspondem as frações eluídas com tampão B-co. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 ml para lavagem, 2 mL para 10, 20 e 40% e 4 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

As frações eluídas além de estarem enriquecidas com NifAQ6, também estão enriquecidas com GlnK, o que indica que possivelmente as duas proteínas estão interagindo durante a purificação (figura 12). Apesar desse indício de uma interação *in vitro* entre as duas proteínas, ainda é importante verificar a interação com mais precisão nos ensaios de *pull-down*. Para que esses ensaios sejam realizados, é interessante que a proteína NifAQ6 esteja pura, na ausência de GlnK. Sendo assim, as frações que foram eluídas com 20, 40 e 100% de tampão A-co foram unidas e diluídas até a concentração de 20 mM de Imidazol. Em seguida a amostra foi injetada na coluna HiTrap Heparin 1 mL, equilibrada com tampão A-hep. As proteínas não ligadas à coluna e a fração resultante da lavagem da mesma com tampão A-co foram coletadas separadamente. A eluição foi feita com tampão B-hep em um gradiente em degraus de 10, 20, 40 e 100% de tampão. O resultado dessa purificação pode ser observado na figura 13.

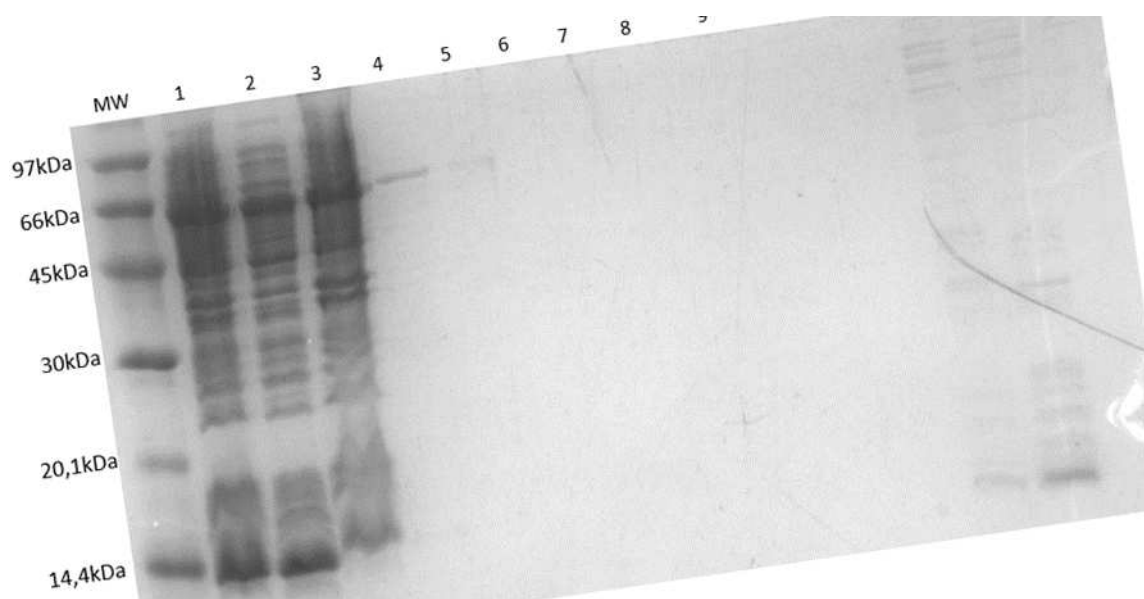


FIGURA 14 -PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE HEPARINA. O MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). As linhas 1, 2 e 3 correspondem respectivamente ao extrato bruto, fração solúvel e fração insolúvel. A linha 4 contém as proteínas não ligadas, a linha 5 é fração obtida da lavagem da coluna com tampão A-hep. A linha 6 se refere a concentração de 5% de tampão B-hep. As linhas 7 e 8 se referem a concentração de 10% de tampão B-hep. As linhas 9 e 10 se referem a concentração de 20% de tampão B-hep. As linhas 11, 12, 13 e 14 se referem a concentração de 100% de tampão B-hep.

Esta segunda etapa de purificação mostrou que a proteína NifAQ6 não interage bem com a coluna de heparina, e que a recuperação de NifAQ6 foi muito baixa. Portanto, os próximos passos foram tentar otimizar a purificação de NifAQ6 utilizando diferentes colunas. A primeira coluna utilizada foi a HiTrap QFF FF de 1 mL, onde foi injetado a fração solúvel, proveniente da expressão de NifAQ6 a partir do plasmídeo pAAS1637. A coluna foi pré-equilibrada com tampão A-hep, a lavagem da coluna foi feita com o mesmo tampão. E a eluição foi realizada utilizando o tampão B-hep, o resultado pode ser observado na figura 14.

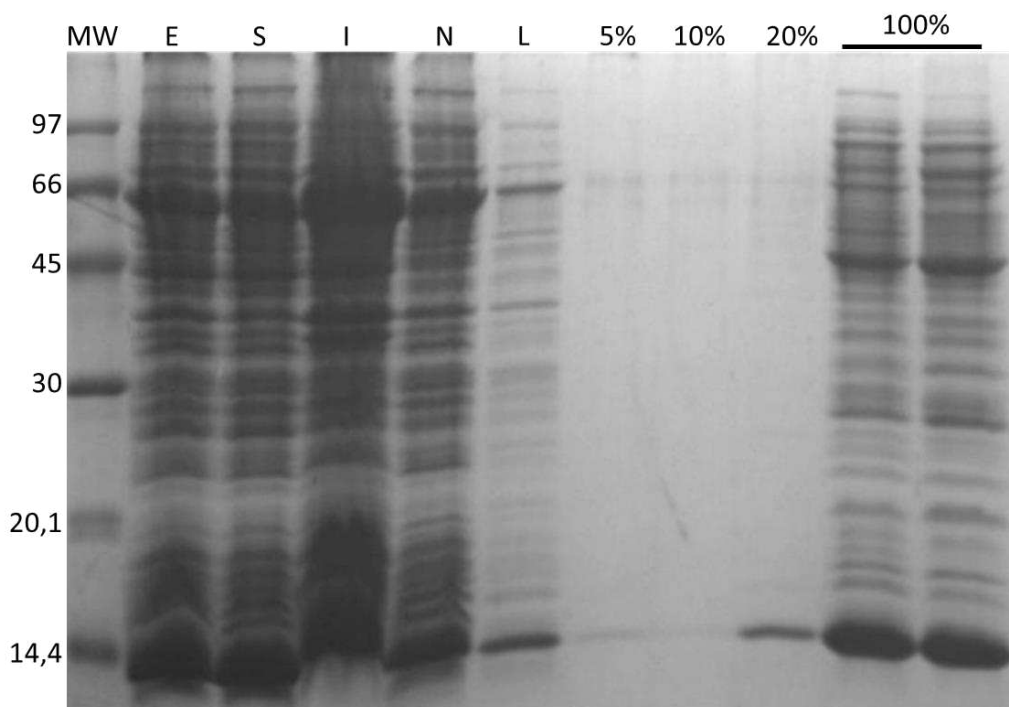


FIGURA 15- PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE TROCA IÔNICA. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). S, proteínas solúveis, E, extrato bruto, I, proteínas insolúveis, N, proteínas que não se ligaram a coluna, L, lavagem com 5 mL de tampão A-hep. 5, 10, 20 e 100% correspondem as frações eluídas com tampão B-hep. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 ml para lavagem, 1 mL para 10, 20 e 40% e 2 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

Neste gel (figura 14), podemos observar que novamente a proteína de interesse se encontra em maior parte na fração não ligada. O passo seguinte foi testar a coluna HiTrap Phenyl FF de 1 mL, uma coluna de interação hidrofóbica. Nessa tentativa foi injetada a fração não ligada proveniente da purificação interior, na coluna previamente carregada com tampão B-hep. A lavagem foi realizada com 5 mL do mesmo tampão e a eluição foi feita em degraus utilizando o tampão A-hep (figura 15).

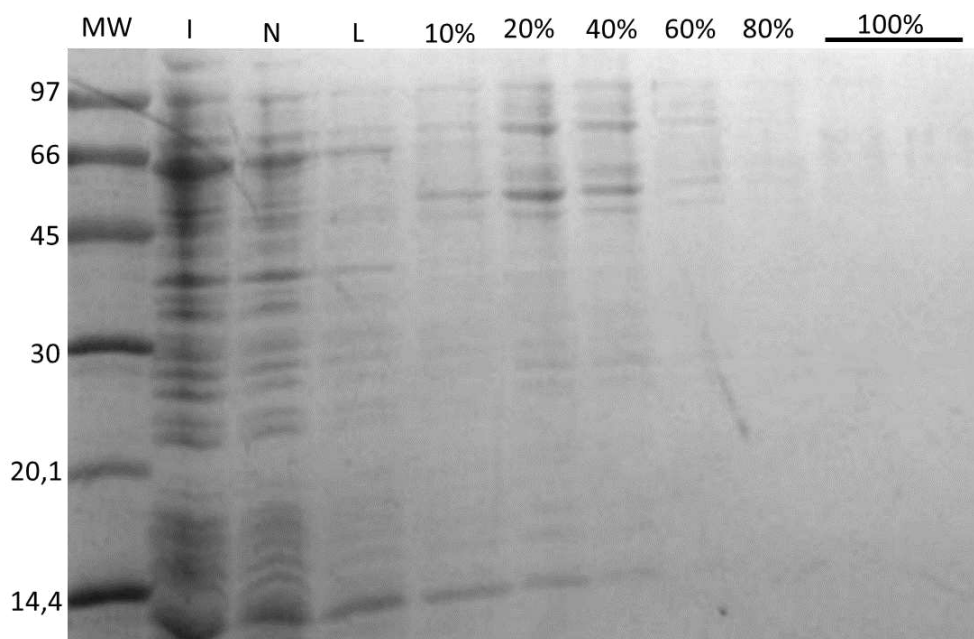


FIGURA 16- PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA. MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). I, proteínas injetadas, N, proteínas que não se ligaram a coluna, L, lavagem com 5 mL de tampão B-hep. 10, 20, 40, 60, 80 e 100% correspondem as frações eluídas com tampão A-hep. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 ml para lavagem, 1 mL para 10, 20, 40, 60 e 80% e 2 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

Mais uma vez, a maior parte da NifAQ6 se encontra na fração que não se ligou a coluna. Outra coluna de interação hidrofóbica foi testada, a HiTrap Octyl FF de 1 mL. Foi adicionado a fração não ligada na coluna da última purificação KCl até a concentração final de 1 M de sal. Em seguida essa fração foi injetada na coluna pré-equilibrada com tampão B-hep. A eluição foi feita em um gradiente em degraus com 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100% de tampão A-hep (figura 16).

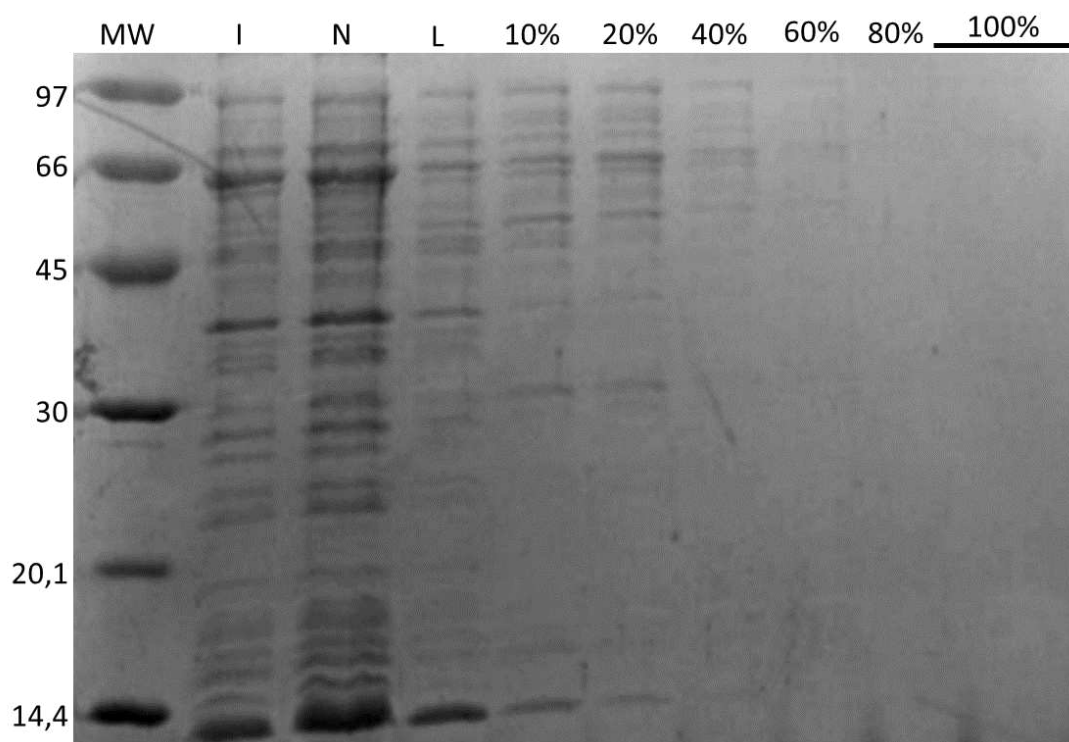


FIGURA 17 - PURIFICAÇÃO DE NifAQ6 EM COLUNA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA. . MW corresponde ao marcador de peso molecular (kDa, valores indicados à esquerda). I, proteínas injetadas, N, proteínas que não se ligaram a coluna, L, lavagem com 5 mL de tampão B-hep. 10, 20, 40, 60, 80 e 100% correspondem as frações eluídas com tampão A-hep. As frações foram coletadas em volumes diferentes, 5 ml para lavagem, 1 mL para 10, 20, 40, 60 e 80% e 2 mL para 100%. Cinco microlitros de cada fração foram aplicados no gel SDS-PAGE 15%.

Como novamente a maior parte da proteína de interesse se encontra na fração não ligada, nenhuma dessas colunas parecem ser as corretas para purificar a NifAQ6, pelo menos não nas condições e tampões testados. Sendo assim, o protocolo de purificação definido para seguir os experimentos se mantém sendo o que é utilizado a coluna HiTrap Chelating carregada com íons cobalto. Para a diálise as frações enriquecidas com NifAQ6 foram dialisadas contra o tampão de diálise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 50% glicerol e 100 mM Imidazol). É importante mencionar aqui, que sem imidazol, a proteína NifAQ6 tende a precipitar durante a diálise, portanto foi testado algumas concentrações de imidazol durante a diálise. E na presença de 100 mM de imidazol, a proteína parece se manter mais estável. Por fim, a NifAQ6 purificada foi armazenada a 4°C até o momento do uso.

6.6. URIDILILAÇÃO DA PROTEÍNA His-GlnB

Esse ensaio foi feito como descrito na seção 4.7.11, foi aplicado 5 µL da reação em um gel de poliacrilamida não desnaturante, a corrida foi realizada a 100 V por 4 horas para separação das bandas. Cada resíduo de UMP adicionado à proteína aumenta a taxa de migração dos trímeros de PII, ou seja, quanto mais uridililada a proteína, mais rápida é a migração. A

proteína uridililada foi a GlnB com cauda de histidina (figura 17), o resultado esperado para a proteína uridililada seria de um a quatro bandas, dependendo do estado de uridililação dos trímeros de PII (PII-UMP_0 , PII-UMP_1 , PII-UMP_2 , PII-UMP_3), no entanto nesse gel é possível observar seis bandas. A explicação mais plausível para esse efeito seria a interação entre dois trímeros de PII.

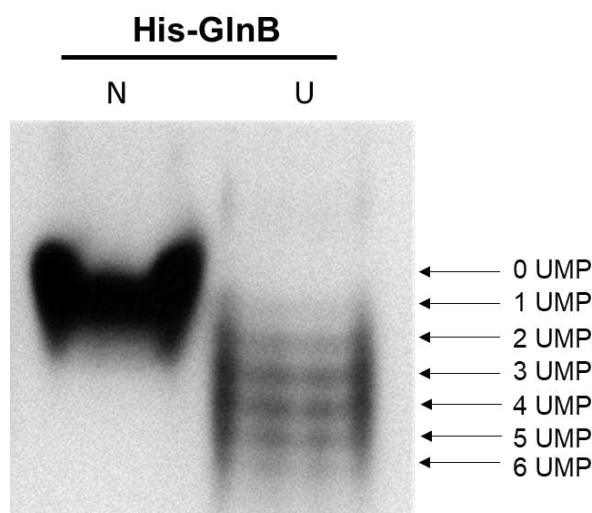


FIGURA 18- URIDILILAÇÃO DE His - GlnB COM CAUDA DE HISTIDINA. N corresponde a proteína não uridililada e U a proteína após o experimento de uridililação. Os números 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 à direita indicam a presença de um, dois, três, quatro, cinco, ou seis monômeros de PII uridililados na preparação.

6.7. ENSAIOS DE *PULL-DOWN*

Os ensaios de *pull-down* foram realizados para observar a interação direta entre a NifAQ6 e as proteínas PII. O primeiro ensaio foi feito com as proteínas GlnK nativa e NifAQ6 com cauda de histidina purificadas como descrito nos itens (4.7.6 e 4.7.9). O primeiro ensaio foi realizado na presença dos efetores que se ligam a PII (3 mM ATP, 10 μ M ou 2 mM 2OG); no entanto, não foi possível observar interação entre as proteínas, o que levou a supor que seria possível que estivesse faltando algum cofator necessário para interação. Por isso, o ensaio seguinte foi realizado com os possíveis cofatores que estão relacionados ao metabolismo de carbono (ATP, 2OG, solução de microelementos, casaminoácidos, FMN, NADPH, NADH, NAD^+ e NADP^+). Como esse ensaio foi preliminar, as reações foram divididas entre cofatores oxidados e reduzidos, o desenho experimental pode ser observado na tabela abaixo.

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ATP (3 mM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2OG (10 µM)	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2OG (2 mM)	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Microelementos (10%)	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Casaminoácidos (1%)	-	-	-	-	-	+	-	-	-
FMN (2 mM)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NADPH (2 mM)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NADH (2 mM)	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NAD ⁺ (2 mM)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
NADP ⁺ (2 mM)	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LB (1%)	-	-	-	-	-	-	-	-	+

O resultado desses ensaios pode ser visualizado na figura 17.

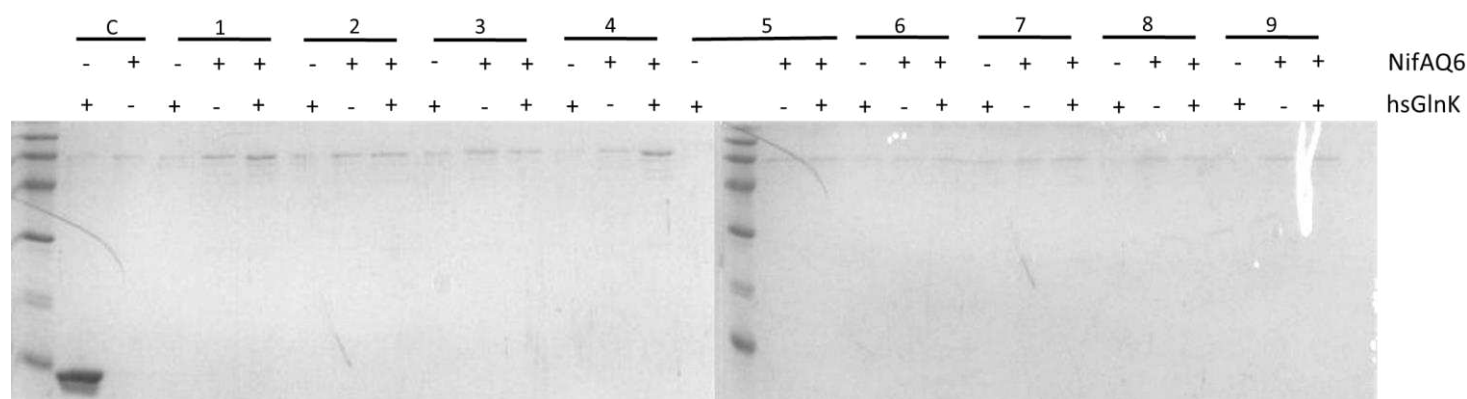


FIGURA 19 - ANÁLISE POR SDS - PAGE DE FRAÇÕES ELUÍDAS DE MAGNEHIS APÓS ENSAIOS DE INTERAÇÃO GlnK E NifAQ6 PURIFICADAS. Cinco microlitros de cada fração foram analisados por SDS – PAGE em gel 15%. A primeira banda corresponde ao marcador de peso molecular (kDa). Os sinais de “-” e “+” indicam ausência e presença de NifAQ6 e GlnK. Os números correspondem aos ensaios descritos na tabela acima.

Como é possível observar na figura 17, não se pôde recuperar GlnK em nenhuma das condições testadas, e nenhum dos efetores parece fazer diferença. Uma explicação possível aventada foi que a quantidade de NifAQ6 utilizada neste ensaio não seria suficiente para observar a captura de GlnK. Uma vez que não foi possível obter NifAQ6 purificada em quantidade, optou-se por realizar o ensaio usando, em vez de NifAQ6, as proteínas PII de *H. seropedicae* com cauda de histidina como *bait*. Para isso, os genes que codificam GlnK e GlnB foram clonados no vetor pET28a, com o objetivo de expressar as duas proteínas com cauda de histidina, conforme descrito na seção 4.7.3. Assim, as proteínas PII, mais fáceis de obter em

quantidade e pureza adequadas, seriam as proteínas a interagir com a resina Magnehis, e seria possível utilizar a fração solúvel obtida da superexpressão de NifAQ6 nativa, a partir do plasmídeo pAAS1518, em vez de NifAQ6 purificada.

Sob essas condições, os primeiros ensaios foram realizados com 30 µg de PII e 200 µL da fração solúvel obtida da superexpressão de NifAQ6 nativa, a partir do plasmídeo pAAS1518. Esses ensaios foram realizados na ausência e presença dos efetores 2OG (10 µM ou 2 mM), ATP (3 mM) e ADP (3 mM). A escolha da concentração dos cofatores foi realizada baseado no estudo de Oliveira et al., 2015, em que se caracterizou a ligação dos efetores às proteínas PII de *H. seropedicae*, calculando a afinidade de cada efector aos três sítios de ligação a proteína GlnK.

Neste ensaio de interação, foi avaliada a capacidade de interação tanto de GlnB quanto GlnK com NifAQ6. Nos ensaios mostrados nas figuras 19 e 20, é possível observar que há interação direta entre NifAQ6 e as proteínas PII, GlnB e GlnK, e que, além disso, essa interação parece não depender dos efetores adicionados. Já no ensaio mostrado na figura 21, onde foi utilizado a proteína GlnB uridililada com cauda de histidina como *bait*, nota-se que os efetores parecem influenciar na interação com NifA. Visto que nos ensaios com ATP e ATP + 2OG foi possível observar bandas com maior sinal de NifAQ6 em relação aos controles.

No trabalho de Oliveira et al. (2012), foi observado um resultado similar através de um experimento de proteólise limitada usando o domínio GAF de NifA de *H. seropedicae* purificado e GlnK. Nesse experimento, os autores verificaram que os efetores (ATP e 2OG) não parecem influenciar na interação entre o domínio GAF de NifA e GlnK não uridililada. No entanto, nesse mesmo trabalho, ele observou que, utilizando GlnK uridililada, a presença e a concentração dos efetores parece influenciar na interação de GlnK com o domínio GAF de NifA. Em outras proteobactérias, os efetores ATP, ADP e 2OG, influenciam na interação da NifA com outras proteínas. Por exemplo, em *A. vinelandii*, o ATP é necessário para estabilizar a ligação entre NifL e NifA (MONEY et al., 1999). Já o 2-OG se liga ao domínio GAF de NifA de *A. vinelandii*, atenuando a repressão por NifL (LITTLE & DIXON, 2003). Em *Azospirillum brasilense* os efetores 2-OG e ATP são necessários para interação do domínio GAF N-terminal de NifA com a proteína GlnB, e sem esses efetores a interação não é observada (SOTOMAIOR et al., 2012).

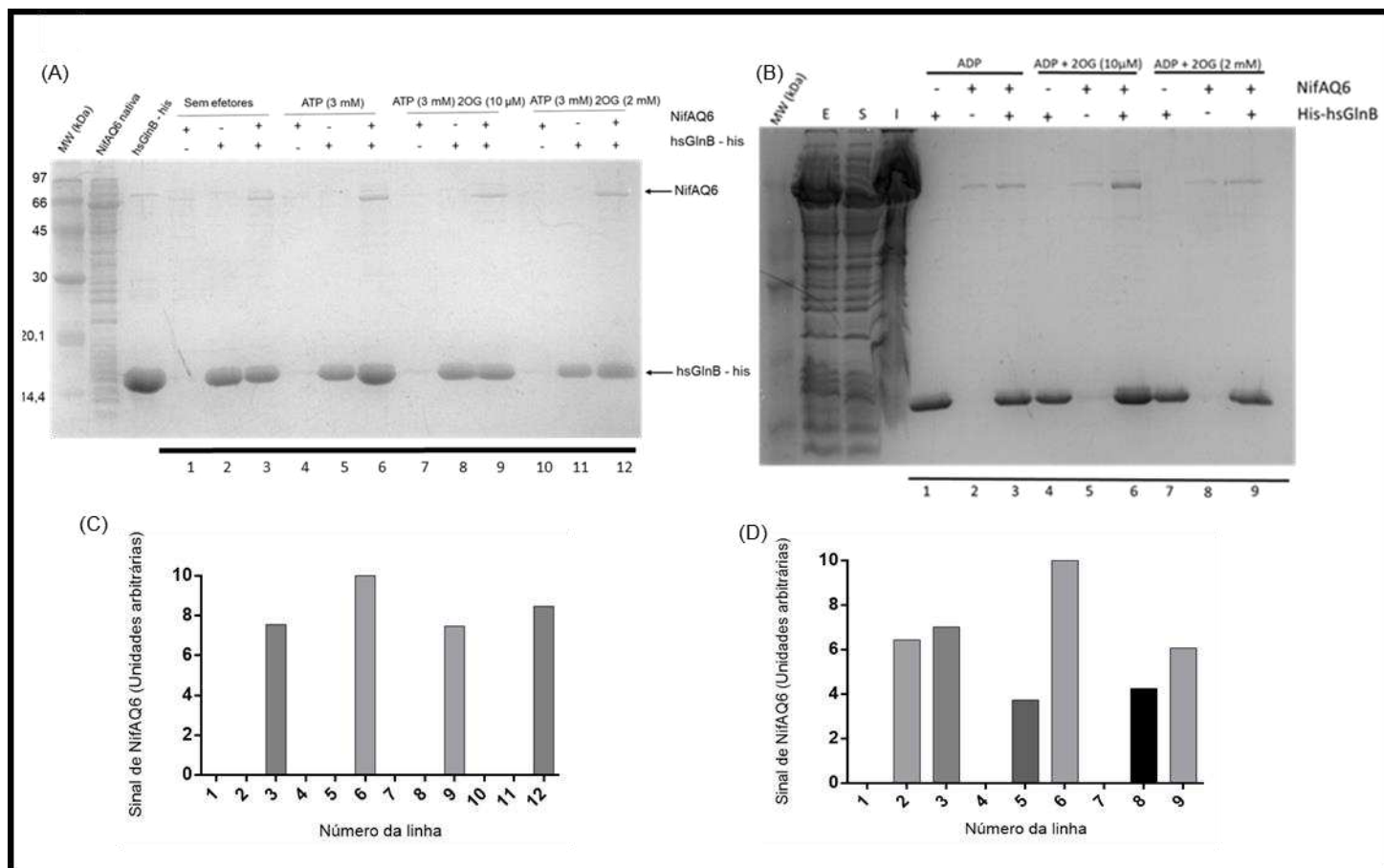


FIGURA 20 - ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE NifAQ6 COM His-GlnB. (A) Frações eluídas de Magnehis após o ensaio de interação com os cofatores ATP e 2OG. Cinco microlitros de cada fração foram analisados por SDS-PAGE em gel 15%. Os sinais “-” indicam ausência de proteína, enquanto os sinais “+” indicam presença de proteína. (B) Frações eluídas de Magnehis após o ensaio de interação com o cofator ADP, E, extrato bruto, S, fração solúvel (que foi utilizada no ensaio), fração insolúvel. % Os sinais “-” indicam ausência de proteína, enquanto os sinais “+” indicam presença de proteína. (C) e (D) correspondem a quantificação do sinal de NifAQ6 por densitometria.

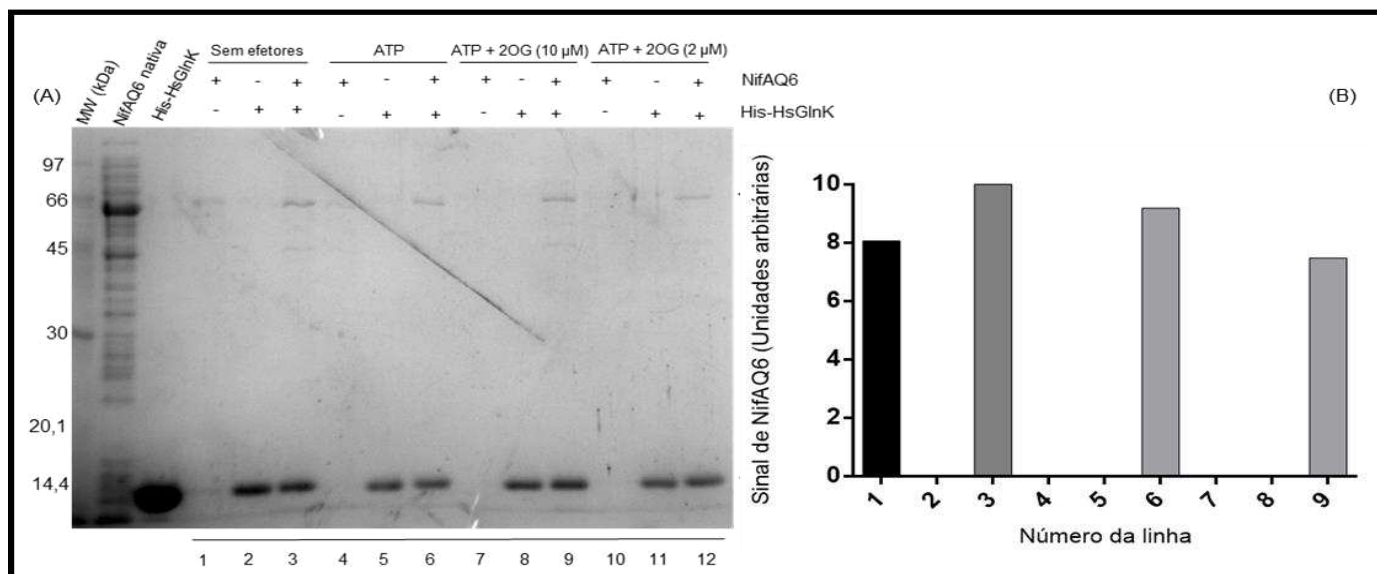


FIGURA 21 - ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE NifAQ6 COM His-GlnK. (A) Frações eluídas de Magnehis após o ensaio de interação com os cofatores ATP e 2OG. Cinco microlitros de cada fração foram analisados por SDS-PAGE em gel 15%. Os sinais “-” indicam ausência de proteína, enquanto os sinais “+” indicam presença de proteína. (B) corresponde a quantificação do sinal de NifAQ6 por densitometria.

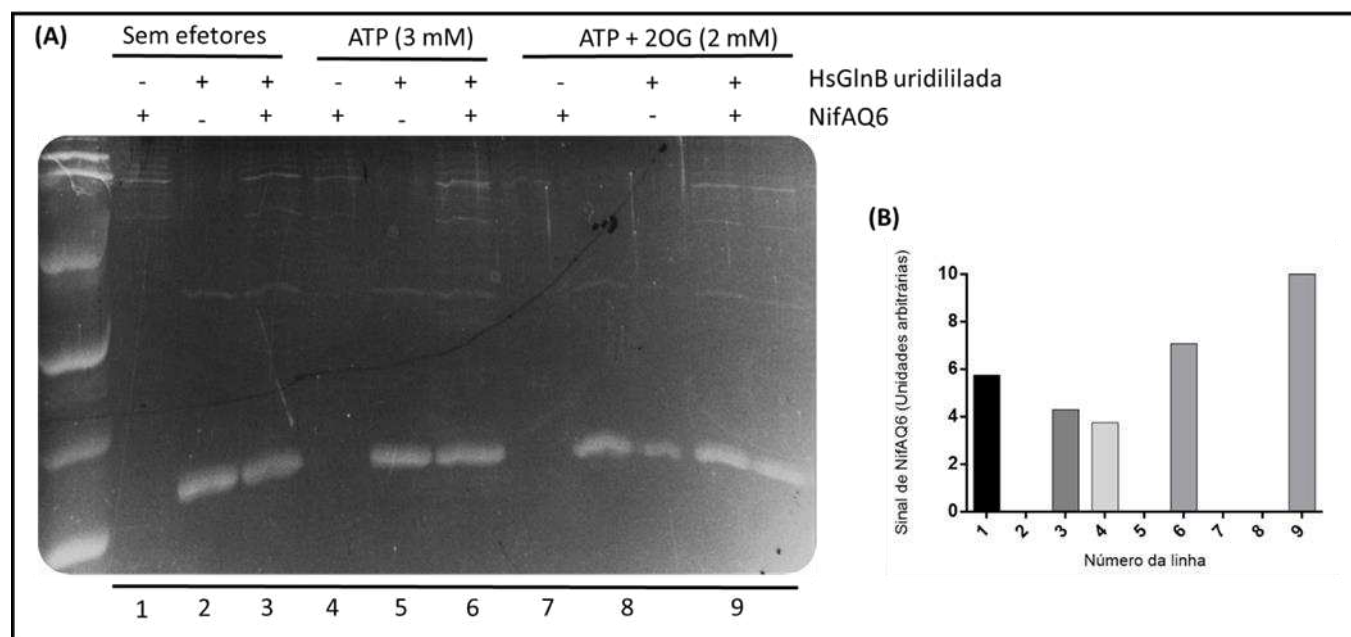


FIGURA 22- INTERAÇÃO DE NifAQ6 COM His- GlnB URIDILILADA. (A) Frações eluídas de Magnehis após o ensaio de interação com o cofator ATP e 2OG. Cinco microlitros de cada fração foram analisados por SDS-PAGE em gel 15%. Os sinais “-” indicam ausência de proteína, enquanto os sinais “+” indicam presença de proteína. (B) corresponde a quantificação do sinal de NifAQ6 por densitometria.

Com a intenção de descobrir quais resíduos de NifAQ6 estão envolvidos na interação com as proteínas PII, utilizamos o mesmo desenho experimental do *pull-down* realizado acima, mas agora utilizando outras 43 variantes de NifAQ6. Essas variantes foram construídas por diversas abordagens por Stefanello (2011, 2014, 2018). Os resultados apresentados são preliminares, devido a dificuldades com a expressão de algumas das variantes testadas e à dificuldade apresentada por algumas das variantes, que interagem moderadamente com a resina na ausência de PII nas condições experimentais testadas. As variantes de NifA que geraram os resultados mais claros são mostradas na figura 22. Estes resultados sugerem que as variantes expressas a partir dos plasmídeos 255 – 1, 255 – 2 e 253 – 1 (tabela 1), são capazes de interagir com GlnB, o que indica que os resíduos 190, 185, 194 e 341, não estão envolvidos na interação com a GlnB, ou que pelo menos as substituições realizadas não influenciaram na interação. Uma vez que estas variantes pertencem a um grupo de mutantes aleatórios de NifAQ6 que foi selecionado para ter atividade na *ausência* de GlnK (STEFANELLO, 2018), este resultado está de acordo com o modelo proposto de separação espacial entre a porção do domínio GAF que interage com GlnK (localizada entre os resíduos 14-164) e a porção que transmite a inibição do domínio GAF para o domínio central (resíduos 176-194) – mutações nesta última região tornam a proteína independente de GlnK, embora não alterem a interação entre NifA e GlnK.

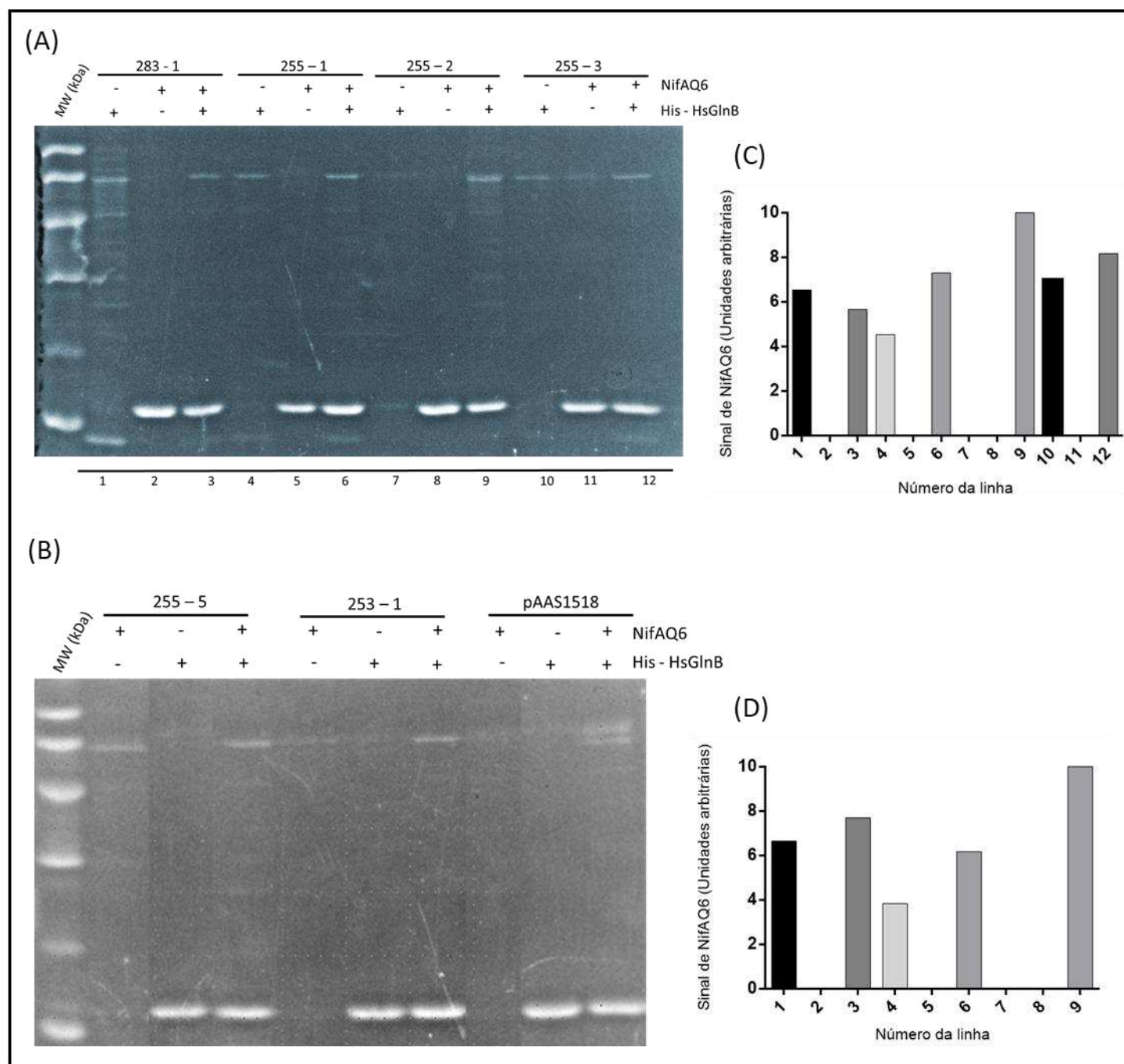


FIGURA 23 – ENSAIOS DE INTERAÇÃO DE GlnB COM VARIANTES DE NifAQ6. (A) e (B) Frações eluídas de Magnehis após o ensaio de interação. Cinco microlitros de cada fração foram analisados por SDS-PAGE em gel 15%. Os sinais “-” indicam ausência de proteína, enquanto os sinais “+” indicam presença de proteína. (C) e (D) correspondem a quantificação do sinal de NifAQ6 por densitometria.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho pôde mostrar, pela primeira vez, a interação entre uma variante de NifA de *H. seropedicae* e proteínas PII, por meio de um ensaio bastante aceito para a demonstração de interação proteína-proteína, que há interação direta entre NifA e PII de *H. seropedicae*, e que a interação ocorre mesmo na ausência de efetores de PII. O desenvolvimento desta ferramenta será bastante útil para complementar resultados obtidos com a avaliação de atividade de sistemas NifA/PII em *E. coli*, permitindo diferenciar entre a ausência de atividade de NifA devida à ausência de interação entre NifA e PII e a devida a outras causas.

Os experimentos deste trabalho dão suporte à sugestão feita por Oliveira e colaboradores (2012) de que a interação entre NifA e GlnK pode ocorrer sempre, com a ativação só ocorrendo na presença da combinação correta de efetores de PII. Isso permite refinar um pouco mais o modelo do mecanismo fisiológico para a regulação da atividade de NifA em resposta a amônio (figura 22), sumarizado por Stefanello (2018); a proposta de interação entre PII e NifA na presença de amônio / baixa concentração de 2OG, torna-se mais provável.

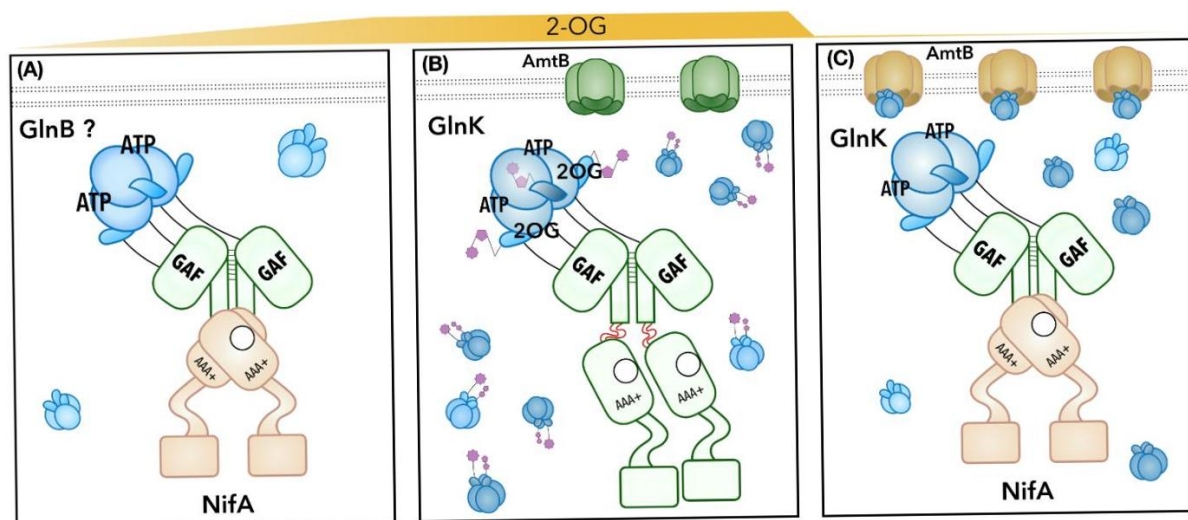


FIGURA 24- MECANISMO FISIOLÓGICO PARA A REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE HsNifA EM RESPOSTA A AMÔNIO. (A), presença de amônio. O domínio GAF dimérico de hsNifA mantém os domínios AAA+ dimerizados através da hélice conectora intacta, inibindo sua atividade. GlnB é a única proteína PII presente no citoplasma, e interage com NifA, independente da concentração intracelular de 2-OG. Mas não é capaz de promover a conformação ativadora. (B), ausência de amônio. GlnK é produzida em grande quantidade a partir do operon *NtrC* – dependente *glnKamtB*. GlnK ligada a 2OG interage com o domínio GAF de hsNifA de modo a causar alterações conformacionais no domínio GAF, que em última instância levam a desestabilização da hélice que conecta os domínios GAF e AAA+ (em vermelho). A interação GAF-GlnK envolve a face de GlnK que contém o T-loop. A uridililação não tem importância direta, e o T-loop propriamente dito provavelmente não interage. (C), choque de amônio. Com o aumento súbito da concentração de amônio, GlnK é desuridilada e passa a interagir com AmtB na membrana, tornando-se menos disponível no citoplasma. Ao mesmo tempo, a ausência de 2OG converte GlnK ligada a hsNifA à sua conformação não-ativadora, permitindo que a hélice conectora entre GAF e AAA+ se reestruture, forçando os domínios AAA+ a dimerizarem-se novamente, inativando hsNifA.

8. REFERÊNCIAS

- ARSENE, F; KAMINSKI, A; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by PII in *Azospirillum brasilense*: evidence for regulatory role of the NifA N-Terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v.178, n. 16, p. 4830-4838, 1996.
- ATKINSON, M, R. Reversible uridylylation of the *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates its ability to stimulate the dephosphorylation of transcription factor nitrogen regulator I (NRI or NtrC). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 45, p. 28288-28293, 1994.
- BALDANI, J, I; BALDANI, V, L, D; SELDIN, L; DÖBEREINER. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. Nov., sp. nov., a Root- associated nitrogen- fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.
- BENELLI, E, M.; SOUZA, E, M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L, U.; PEDROSA, F, O. Evidence for two possible glnB – type genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 14, p. 4623 – 4626, 1997.
- BENELLI, E, M.; BUCK, M.; SOUZA, E, M.; YATES, M, G.; PEDROSA, F, O. Uridylylation of the PII protein from *Herbaspirillum seropedicae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, p.309-214, 2001.
- BONATTO, A, C.; COUTO, G, H.; SOUZA, E, M.; ARAÚJO, L, M.; PEDROSA, F, O.; NOINDORF, L.; BENELLI, E, M. Purification and characterization of the bifunctional uridylyltransferase and the signal transducing proteins GlnB and GlnK from *Herbaspirillum seropedicae*. **Protein Expression and Purification**, v. 55, p. 293 – 299, 2007.
- BONATTO, A, C.; SOUZA, E, M.; OLIVEIRA, M, A, S.; MONTEIRO, R, A, M.; CHUBATSU, L, S.; HUERGO, L, F.; PEDROSA, F, O. Uridylylation of *Herbaspirillum seropedicae* GlnB and GlnK proteins is differentially affected by ATP, ADP and 2-oxoglutarate *in vitro*. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 643-652, 2012.
- BURRIS, R, H. Nitrogenases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9339-9342, 1991.
- CANNON, F. C.; DIXON, R. A.; POSTGATE, J. R. Chromosomal integration of *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes in *E. coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 80, p. 227-239, 1974.
- CARR, P, D.; CHEAH, E; SUFFOLK, P, M.; VASUDEVAN, S, G.; DIXON, N, E.; OLLIS, D, L. X-Ray structure of the signal transduction protein PII from *Escherichia coli* at 1,9 Å. **Acta Crystallographica**, v. 52, p. 93-104
- CASTAÑO, I.; BASTARRACHEA, F. *glnF-lacZ* fusions in *Escherichia coli*: studies on *glnF* expression and its chromosomal orientation. **Molecular & General Genetics**, v. 195, n. 1-2, p.228-233,1984., 1996.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, G. M.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v.356, p. 197-207, 2012.

CHUNG, C. T.; NIEMALA, S. L.; MILLER, R. H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p.2172-2175, 1989.

COUTTS, G.; THOMAS, G.; BLAKEY, D.; MERRICK, M. Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 4, p. 536 – 545, 2002.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 2, p. 624-634, 2004.

DRUMMOND, M.; WHITTY, P.; WOOTTON, J. Sequence and domain relationships of *ntrC* and *nifA* from *Klebsiella pneumoniae*: homologies to other regulatory proteins. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 1, p. 441-447, 1986.

FISCHER, H. M.; BRUDERER, T.; HENNECKE, H. Essential and non-essential domains in the *Bradyrhizobium japonicum* NifA protein: identification of indispensable cysteine residues potentially involved in redox reactivity and/ or metal binding. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 5, 1988.

FISCHER, H. M. Genetic regulation of nitrogen fixation in Rhizobia. **Microbiological reviews**, v. 58, n.3, p. 352-386, 1994.

FU, H.; BURRIS, R. H. Ammonium Inhibition of nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3128- 21-75, 1989.

FORCHHAMMER, K.; MARSAC, N. T. The PII protein in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942 is modified by serine phosphorylation and signals the cellular N-status. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 84 – 91, 1994.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, p. 293-296, 2008.

HE, L.; SOUPENE, E.; KUTSU, S. NtrC is required for control of *Klebsiella pneumoniae* NifL activity. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 23, p. 7446 – 7455, 1997.

HILL, S.; AUSTIN, S.; EYDMANN, T.; JONES, T.; DIXON, R. Azotobacter vinelandii NIFL is a flavoprotein that modulates transcriptional activation of nitrogen- fixation genes via a redox-sensitive switch. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n.5, p.2143-2148, 1996.

- HUERGO, L, F.; NOINDORF, L.; GIMENES, C.; LEMGRUBER, R, S, P.; CORDELLINI, D, F.; FALARZ, J.; CRUZ, L, M.; MONTEIRO, R, A.; PEDROSA, F, O.; CHUBATSU, L, S; SOUZA, E, M.; STEFFENS, M, B, R. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* reveals ammonium Induced AmtB-dependent membrane sequestration of PII proteins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 308, p. 40 – 47, 2010.
- HUERGO, L, F; CHANDRA, G; MERRICK, M; PII signal transduction proteins: nitrogen regulation and beyond. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 2, p. 251-283, 2013.
- HUERGO, L, F; PEDROSA, F, O; MULLER-SANTOS, M; CHUBATSU, L, S; MONTEIRO, R, A; MERRICK, M; SOUZA, E, M. PII signal transduction proteins: pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology Research**, v. 158, n. 1, p. 179-190, 2012.
- INABA, J.; THORNTON, J.; HUERGO, L, F.; MONTEIRO, R, A.; KLASSEN, G.; PEDROSA, F, O.; MERRICK, M.; SOUZA, E, M. Mutational analysis of GlnB residues critical for NifA activation in *Azospirillum brasilense*. **Microbiological Research**, v. 171, p. 65-72, 2014.
- JAVELLE, A; SEVERI, E.; THORNTON, J.; MERRICK, M. Ammonium sensing in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279; n. 10; p. 8530- 8538, 2004.
- JAVELLE, A; THOMAS, G.; MARINI, A.; KRÄMER, R.; MERRICK, M. *In vivo* functional characterization of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB: evidence for metabolic coupling of AmtB to glutamine synthetase. **Biochemical Journal**, v. 390, p. 215-222, 2005.
- JIANG, P.; NINFA, A, J. Regulation of Autophosphorylation of *Escherichia coli* Nitrogen Regulator II by the PII signal transduction protein. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1906- 1911, 1999.
- KHADEMI, S; O'CONNELL, J.; REMIS, J.; ROBLES-COLMENARES, Y.; MIERCKE, J, W.; STROUDT, R, M. Mechanism of ammonia transport by Amt/ MEP/Rh: structure of AmtB at 1,35 Å. **Science**, v. 305, p. 1586- 1594, 2004.
- KLEINER, D. Bacterial ammonium transport. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 87-100, 1985.
- KUTSU, S.; SANTERO, E.; KEENER, J.; POPHAM, D.; WEISS, D. Expression of σ^{54} (*ntrA*) - Dependent Genes is probably United by a common mechanism. **Microbiological Reviews**, v. 53, n.3, p. 367-376, 1989.
- LANZILOTTA, W, N.; SEEFELDT, L, C. Changes in the midpoint potentials of nitrogenase metal centers as a results of iron protein- Molybdenum- Iron protein complex formation. **Biochemistry**, v. 36, p. 12976-12983, 1997.
- LITTLE, R.; DIXON, R. The amino-terminal GAF domain of *Azotobacter vinelandii* NifA binds 2-oxoglutarate to resist inhibition by NifL under nitrogen-limiting conditions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p.28711 – 28718, 2003.

LITTLE, R.; COLOMBO, V.; LEECH, A.; DIXON, R. Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the *Azotobacter vinelandii* NifL- NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15472-15481, 2002.

MARTINEZ-AGUDO, I.; LITTLE, R.; JOHNSON, P.; DIXON, R. NifL- NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex that integrates environmental signals. **Journal of bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 601-610, 2004.

MERRICK, M. Post- translational modification of PII signal transduction proteins. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 763, p. 1-6, 2015.

MERRICK, M, J.; EDWARDS, R, A. Nitrogen Control in Bacteria. **Microbiological Reviews**; v. 59, n. 4, p. 604-622, 1995.

MOREIRA, F, M, S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R, S, A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia, e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.

MONEY, T.; JONES, T.; DIXON, R.; AUSTIN S. Isolation and properties of the complex between the enhancer binding protein NifA and the sensor NifL. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 15, p. 4461-4468, 1999.

MONTEIRO, R, A.; SOUZA, E, M.; FUNAYAMA, S.; YATES, M, G.; PEDROSA, F, O.; CHUBATSU, L, S. Expression and functional analysis of an N- truncated NifA protein of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS Letters**, v.447, n. 2-3, p.283-286, 1999.

MONTEIRO, R, A.; SOUZA, E, M.; YATES, M, G.; PEDROSA, F,O.; CHUBATSU, L, S. In-trans regulation of the N- truncated-NIFA protein of *Herbaspirillum seropedicae* by the N- terminal domain. **FEMS Microbiology Letters**, v.180, n. 2, p. 157-161, 1999b.

MONTEIRO, R, A; SOUZA, E, M; WASSEM, R; YATES, M, G; PEDROSA, F, O; CHUBATSU, L, S. Inter-domain cross-talk controls the NifA protein activity of *Herbaspirillum seropedicae*. **FEBS letters**, v. 508, n.1, p.1-4, 2001.

MONTEIRO, R, A.; SOUZA, E, M.; YATES, G, Y.; STEFFENS, M, B, R.; PEDROSA, F, O.; CHUBATSU, L, S. Expression, purification, and functional analysis of the C- terminal domain of *Herbaspirillum seropedicae* NifA protein. **Protein Expression and Purification**, v. 27, n. 2, p. 313-218, 2003.

MOURE, V. R.; RAZZERA, G.; ARAÚJO, L.M.; OLIVEIRA, M. A. S.; GERHARDT, E. M.; MULLER-SANTOS, M.; ALMEIDA, F.; PEDROSA, F. O.; VALENTE, A. P.; SOUZA, E. M.; HUERGO, L. F. Heat stability of Proteobacterial PII protein facilitate purification using a single chromatography step. **Protein Expression and purification**, v.81, p. 83-88, 2011.

NINFA, A, J.; MAGASANIK, B. Covalent modification of the *glnG* product, NRI, by the *glnL* product, NRII, regulates the transcription of the *glnALG* operon in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 16, p. 5909-5913, 1986.

NINFA, A, J; ATKINSON, R, M. PII signal transduction proteins. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 172-179, 2000.

NINFA, A, J; JIANG, P. PII signal transduction proteins: sensors of α -ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 168-173, 2005.

NOINDORF, L; BONATTO, A, C; MONTEIRO, R, A; SOUZA, E, M; RIGO, L, U; PEDROSA, F, O; STEFFENS, M, BR, CHUBATSU, L, S. Role of PII proteins in nitrogen fixation control of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. **BMC Microbiology**, v. 11, n.8, p.1-8, 2011.

NOINFORF, L.; REGO, F, G.; BAURA, V, A.; MONTEIRO, R, A.; WASSEM, R.; CRUZ, L, M.; RIGO, L, U.; SOUZA, E, M.; STEFFENS, M, B, R.; PEDROSA, F, O.; CHUBATSU, L, S. Characterization of the *orf1glnKamtB* operon of *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives Microbiology**, v. 185, p. 55 – 62, 2006.

OLIVARES, F, L.; JAMES, E, K.; BALDANI, J, I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist Trust**, v. 135, n. 4, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, M, A, S.; BAURA, V, A.; AQUINO, B.; HUERGO, L, F.; KADOWAKI, M, A, S.; CHUBATSU, L, S.; SOUZA, E, M.; DIXON, R; PEDROSA, F, O.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R, A. Role of conserved cysteine residues in *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity. **Research in Microbiology**, v. 160, p.389-395, 2009.

OLIVEIRA, M, A, S.; AQUINO, B.; BONATTO, A, C.; HUERGO, L, H.; CHUBATSU, L, S.; PEDROSA, F, O.; SOUZA, E, M.; DIXON, R.; MONTEIRO, R, A. Interaction of GlnK with the GAF domain of *Herbaspirillum seropedicae* mediates NH_4^+ - regulation. **Biochimie**, v. 94, p. 1041-1047, 2012.

OLIVEIRA, M, A, S.; GERHARDT, E, C, M.; HUERGO, F, L.; SOUZA, E, M.; PEDROSA, F, O.; CHUBATSU, L, S. 2-Oxoglutarate levels control adenosine nucleotide binding by *Herbaspirillum seropedicae* PII proteins. **The FEBS Journal**, v. 282, p. 4797-4809, 2015.

PEDROSA, F, O.; MONTEIRO, R, A.; WASSEM, R.; CRUZ, L, M.; AYUB, R, A.; COLAUTO, N, B.; FERNANDEZ, M, A.; FUNGARO, M, H, P.; GRISARD, E, C.; HUNGRIA, M.; MADEIRA, H, M, F.; NODARI, R, O.; OSAKU, C, A.; PETZLERLER, M, L.; TERENCE, H *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLOS genetics**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2011.

POPHAM, D, L.; SZETO, D.; KEENER, J.; KUSTU, S. Function of a bacterial activator protein that binds to transcriptional enhancers. **Science**, v. 243, n. 4891, p. 629-635, 1989.

PROBER, J. M.; TRAINOR, G. L.; DAM, R. J.; HOBBS, F. W.; ROBERTSON, C. W.; ZAGURSKY, R. J.; COCUZZA, A. J.; JENSEN, M. A.; BAUMEISTER, K. A system for rapid DNA sequencing with the fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. **Science**, v. 238, p. 336 – 341, 1987.

RAPPAS, M.; BOSE, D.; ZHANG, X. Bacterial enhancer-binding proteins: unlocking σ^{54} - dependent gene transcription. **Current Opinion in Structural Biology**, n. 17, p. 110-116, 2007.

RAINA, R.; BAGESHWAR, U. K.; DAS, H. K. The *Azotobacter vinelandii* nifL-like gene: nucleotide sequence analysis and regulation of expression. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 237, p. 400-406, 1992.

RAYMOND, J.; SIEFERT, J. L.; STAPLES, C. R.; BLANKENSHIP, R. E. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

RODRIGUES, T. E.; SOUZA, V. E. P.; MONTEIRO, R. A.; GEHARDT, E. C. M.; ARAÚJO, L. M.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; HUERGO, L. F. *In vitro* interaction between the ammonium transport protein AmtB and partially uridylylated forms of the PII protein GlnZ. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, p. 1203-1209, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain – terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANT' ANNA, F. H.; TRENTINI, D. B.; WEBER, S. S.; CECAGNO, R.; SILVA, S. C.; SCHRANK, I. S. The PII superfamily revised: a novel group and evolutionary insights. **Journal of Molecular Evolution**, v. 68, p. 322-336, 2009.

SHINGLER, V.; BARTILSON, M.; MOORE, T. Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the positive regulator (DmpR) of the phenol catabolic pathway encoded by pVI150 and identification of DmpR as a member of the NtrC Family of transcriptional activators. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 6, p. 1596-1604, 1993.

SOTOMAIOR, P.; ARAÚJO, L. M.; NISHIKAWA, C. Y.; HUERGO, L. F.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; CHUBATSU, L. S.; SOUZA, E. M. Effect of ATP and 2-oxoglutarate on the *in vitro* interaction between the NifA GAF domain and the GlnB protein of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, p. 1135-1140, 2012.

SOUZA, E. M.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Cloning and characterization of the *nifA* from *Herbaspirillum seropedicae* strain Z78. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 425-429, 1991.

SOUZA, E, M; PEDROSA, F, O; DRUMMOND, M; RIGO, L, U; YATES, M, G. Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 2, p. 681-684, 1999.

SOUZA, E, M; PEDROSA, F, O; RIGO, L, U; MACHADO, H, B; YATES, M, G. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and -24/-12 promoter element. **Microbiology**, v. 146, p. 1407-1418, 2000.

STEFANELLO, A, A. **Mutagênese e análise funcional do domínio N-terminal de NifA de *Herbaspirillum seropedicae***. 89 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

STEFANELLO, A, A. **Identificação de resíduos de aminoácidos importantes para a ativação de NifA por PII em *Herbaspirillum seropedicae***. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

STEFANELLO, A, A. **Regulação da atividade de NifA de *Herbaspirillum seropedicae* por proteínas PII em resposta aos níveis de amônio**. Tese (Doutorado em Ciências- Bioquímica), Departamento de Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

STEFANELLO, A, A.; OLIVEIRA, M, A, S.; SOUZA, E, M.; PEDROSA, F, O.; CHUBATSU, L, S.; HUERGO, L, F.; DIXON, R.; MONTEIRO, R, A. Regulation of *Herbaspirillum seropedicae* NifA by the GlnK PII signal transduction protein is mediated by effectors binding to allosteric sites. **BBA – Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 3, p. 1–8, 2020.

STOCK, A, M.; ROBINSON, V, L.; GOUDREAU, P, N. Two component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n.1, p. 183 – 215, 2000.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B, A. Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v.189, p. 113-130, 1986.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v.33, p.103-109, 1985.

WASSEM, R.; SOUZA, E, M.; YATES, M, G.; PEDROSA, F, O.; BUCK, M. Two roles for integration host factor at an enhancer-dependent *nifA* promoter. **Molecular Microbiology**, v. 35, n.4, p. 756 – 764, 2000.

WASSEM, R.; PEDROSA, F, O.; YATES, M, G.; REGO, F, G, M.; CHUBATSU, L, S.; RIGO, L, U.; SOUZA, E, M. Control of autogenous activation of *Herbaspirillum seropedicae* *nifA* promoter by the IHF protein. **FEMS microbiology letters**, v. 212, n. 2, p. 177-182, 2002.

WOOTTON, J, C.; DRUMMOND, M, H. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein engineering**, v. 2, n. 7, p.535-543, 1989.

ZHANG, N.; BUCK, M. A persp WOOTTON, J, C; DRUMMOND, M, H. The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. **Protein engineering**, v. 2, n. 7, p.535-543, 1989. ective on the enhancer dependent bacterial RNA polymerase. **Biomolecules**, v.5, p. 1012-1019, 2015.